

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Departamento de Química Física Aplicada**



**HIDROLIZADOS DE PROTEÍNAS DE HUEVO PARA CONTROLAR EL  
SÍNDROME METABÓLICO Y SUS COMPLICACIONES ASOCIADAS.  
EVALUACIÓN DE SU EFICACIA Y SEGURIDAD EN HUMANOS**



**SILVIA MORENO FERNÁNDEZ**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN**

**(CSIC-UAM)**

**Madrid 2018**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Física Aplicada

**HIDROLIZADOS DE PROTEÍNAS DE HUEVO PARA CONTROLAR EL  
SÍNDROME METABÓLICO Y SUS COMPLICACIONES ASOCIADAS.  
EVALUACIÓN DE SU EFICACIA Y SEGURIDAD EN HUMANOS**

Memoria presentada por:

**Silvia Moreno Fernández**

Para optar al grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN**

**CON MENCIÓN DE “DOCTORADO INTERNACIONAL”**



**CSIC**  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



**Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación**

Trabajo realizado bajo la dirección de:

**Dra. Marta Miguel Castro**

**Dra. Marta Garcés Rimón**

**Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación**

**MARTA MIGUEL CASTRO, CIENTÍFICO TITULAR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN, DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y MARTA GARCÉS RIMÓN, PROFESOR ADJUNTO DE LA UNIVERSIDAD FRANCISCO DE VITORIA**

**HACEN CONSTAR:**

Que el presente trabajo titulado “Hidrolizados de proteínas de huevo para controlar el síndrome metabólico y sus complicaciones asociadas. Evaluación de su eficacia y seguridad en humanos”, que constituye la Memoria que presenta la Licenciada Silvia Moreno Fernández para optar al grado de Doctor, se ha realizado bajo su dirección, en el Departamento de Bioactividad y Análisis de los Alimentos del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Madrid, 3 de Septiembre de 2018

Marta Miguel Castro

Marta Garcés Rimón

*A veces resulta abrumador echar la vista atrás y darme cuenta de todas las personas que han pasado por mi camino en estos cuatro años. Intentar recordarlos a todos se hace difícil, y más difícil se hace todavía reunirlos a todos en unas breves líneas.*

*En primer lugar me gustaría agradecer a mis directoras de tesis, Marta Miguel y Marta Garcés, todo su apoyo y confianza depositada en mí durante estos años. Marta M.: Muchas gracias por darme ese voto de confianza ciega que me llevó hasta donde estoy hoy, gracias por tus enseñanzas y por tu accesibilidad, por hacerme saber, a tu manera, que mi opinión también es importante. Marta G.: Muchas gracias por tu paciencia, por esas largas tardes sentadas revisando textos y resultados y, sobre todo, gracias por todas esas batallas que aún hoy sigues librando por mí.*

*Por supuesto me gustaría agradecer a mi centro de investigación, el CIAL, la oportunidad de realizar mi tesis doctoral en sus instalaciones. A su directora actual, Tiziana Fornari, y a la anterior directora del centro M<sup>a</sup> Victoria Moreno y a todas aquellas personas que forman parte de este excelente centro de investigación y que consiguen que todo salga adelante: Julia, Macarena, Javier Z., Juan Antonio C., Beatriz F., José Luis A., el personal de recepción y un largo etcétera.*

*También quiero agradecer a la universidad Rey Juan Carlos la oportunidad de realizar parte de mi trabajo en sus instalaciones. Gracias en especial a los miembros del grupo de Ciencias Básicas: Visitación, Esperanza, M<sup>a</sup> Carmen, Lupe, Cristina, Gema, José Antonio U., Nancy, y al resto de profesores y compañeros del laboratorio por recibirme siempre con una sonrisa después de meses sin verme, y por haberme echado una mano con todo aquello que he necesitado.*

*To the “Nutrition, Obesity and Cardiovascular Risk” department, from Aix-Marseille University. Jean François Landrier, thank you for accepting my stay. Julien, thank you for your patience teaching me, I truly know you did a huge effort. To Helene, Soumia, Esma, Charlène, Lauriane (a.k.a as Boucanas), Djawed, Clément: You made Marseille great, despite Marseille, thank you. And to all the people from Sylvabelle: Irene, Saif, Nick, Hélène, Giulia, Joris, Victor, etc. I feel lucky for meeting you, thank you for those 4 wonderful months.*

*A Mario Sandoval, por el apoyo que me ofreció durante mis primeros meses de doctorado. Gracias a estos cuatro años de colaboración con su restaurante he aprendido mucho más allá de la ciencia, técnicas que sin duda me han ayudado a enriquecer mi progreso en el futuro.*

*Me gustaría dedicar un agradecimiento muy especial al que, para mí, siempre ha sido el grupo BIOPEP. A sus investigadoras: Rosina López, Lourdes Amigo, Isidra Recio, Blanca Hernández, Beatriz Miralles y especialmente a Elena Molina, por no permitir que mi currículum se perdiera en su bandeja de entrada. En cierto modo, hoy estoy aquí gracias a ella. También a todos mis compañeros de laboratorio. A los que me vieron aprender: Daniel M., Sara, Laura S., Samuel; Laura P., gracias por tu buen humor, a pesar de las circunstancias, por las canciones en el laboratorio y por no perder nunca la sonrisa; Daniel L., gracias por ser tú, por todo lo que me enseñaste en mis primeros meses, y por darme caña cuando me hizo falta; Alba, gracias por todos esos viajes, por tu humor terrible y por sacarnos una sonrisa a diario, incluso después*

de 24 horas despierta. Y también un enorme agradecimiento a los que os quedáis, a todos los que me habéis tenido que soportar en estos últimos meses: Javier, Félix, Pedro, a Leticia por sus risas, sus bailes y sus chistes, a Mónica por su dulzura y apoyo continuo, y a Marta S. por todas nuestras conversaciones en el laboratorio. Muchas gracias a las 3 por nuestros descansos, por vuestro apoyo y por esas tardes de cañas que siempre hacen falta.

Quiero dedicar este párrafo a las personas que antes o después han pasado por Bioactive Gastronomy. Por todos los talleres, por habernos manchado las manos juntos, por todos esos vasitos rellenos de humus, o de hidrolizado. Porque con vosotros he tenido la sensación de formar parte de un gran equipo al que aún le queda un largo camino por delante: Natalia, Laura R., Leire, Javier F., Sunsana, Sara, Yolanda, Beatriz F. y Luis. A Noelia y a Estefanía, por esas tardes de apoyo en el Domino's, o los desayunos en el Vips, por vuestros abrazos y vuestro silencio cuando no hacía falta decir nada más. A Paqui porque tengo la sensación de que te conozco desde siempre.

A todas las personas de Brasil que han pasado por el laboratorio, con las que he compartido largas jornadas de risas en el laboratorio: Danize y Carol. Y por supuesto a Inajara: Te has convertido en una gran amiga en un tiempo muy reducido.

A Jenny, porque has estado ahí siempre. Porque aun siendo una pareja peculiar, siempre nos hemos llevado bien, incluso en convivencia. Muchas gracias por las tardes de exámenes viendo series, por habernos distraído la una a la otra en una carencia absoluta de fuerza de voluntad. Gracias por los cafés y haberme aceptado ciertas barbaridades con una carcajada. Gracias por haberte ido y haber vuelto, y por hacerme saber continuamente que tengo una amiga para lo que necesite.

A mi grupo de amigos: Pablo, Andrea, P. C., Gemma, Sara y Manu. Por todas y cada una de las tardes delante del ordenador, por todas esas burradas dichas (y grabadas para la posteridad), por hacerme reír cuando no tenía ganas y por siempre estar dispuestos a quedar para tomar algo. Pablo, Sara y Andrea: gracias por esas tardes de quejas, con o sin patatitas en la "Taberna del Chupi Lerendi", o donde fuera. Manu: gracias por las cenas a la aventura que siempre salían bien, por las tardes de ponernos al día, y por haberte quedado aquí después de tantas idas y venidas. Todos vosotros habéis hecho muchísimo más llevadero este último año, me habéis hecho reír y me habéis dejado gritar cuando me hizo falta (cuando tenía hambre). Os pido disculpas por esto último, pero sobre todo: gracias por estar ahí.

A Juan Antonio. Con él inicié un proceso diría que más difícil que una tesis doctoral. Le agradezco su trabajo y su dedicación conmigo, todo el esfuerzo que ha puesto por hacerme ver las cosas como son. Gracias a su trabajo, puedo decir que estos años han sido mucho más fáciles de lo que podría haber esperado.

A mi familia: A mi padre por aceptar que no te haya visitado tan a menudo como te habría gustado. Gracias por tener paciencia. A mi madre, por tus consejos, por tu buen humor y por tu insistencia por hacerme dar los pasos que yo no me atrevía a dar. Gracias por todo el esfuerzo y empeño que has puesto en seguir "presente", y no tirar la toalla. Te quiero. Y también un agradecimiento enorme a Jose Luis: porque sin

*intentarlo, te has convertido en un padre, que siempre tiene un buen consejo para ofrecer cuando lo considera necesario. Gracias por haber aparecido en nuestra vida.*

*A Carlos. Por quedarte callado todas esas tardes que llegaba a casa con ganas de discutir con alguien. Gracias por permanecer ahí cuando yo no tenía palabras bonitas para ti. Porque cuando pasaba la tormenta siempre tenías abrazos y besos que regalarme. Muchas gracias por aquel viaje de vuelta desde Alemania, y por demostrarme día tras día que sigues ahí al pie del cañón.*

*Mi último agradecimiento se lo quiero dedicar a una persona muy especial que se cruzó por mi vida menos tiempo del que me habría gustado: Ismael, gracias por cada discusión, por cada día de películas tirados en el sofá y peleándonos por el espacio, gracias por tus bromas, que muchas veces no sabía disfrutar. Gracias por perdonarme mi mal genio, y por enseñarme, a tu manera, que nada es tan importante. Pero sobre todo: gracias por haberme concedido la oportunidad de hoy echarte de menos.*

*“No importa cuánto tiempo mires el camino,  
lo importante es que empieces a caminar”*

# ÍNDICE

<b>RESUMEN/ABSTRACT .....</b>	<b>5</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>13</b>
1.1. OBESIDAD. CONCEPTO, FISIOPATOLOGÍA Y COMPLICACIONES ASOCIADAS .....	15
1.1.1. <i>Alteraciones asociadas a la obesidad: El Síndrome Metabólico y los mecanismos implicados en su desarrollo</i> .....	20
1.1.1.1. La disfunción del tejido adiposo como causa de alteraciones metabólicas .....	22
1.1.1.2. Inflamación.....	26
1.1.1.3. Estrés oxidativo .....	30
1.1.1.4. Insulinorresistencia .....	32
1.1.1.5. Hipertensión.....	34
1.2. MODELOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DEL SÍNDROME METABÓLICO. OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA.....	35
1.3. COMPONENTES DE LOS ALIMENTOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA. EL HUEVO COMO FUENTE DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS. ....	40
1.3.1. <i>Péptidos bioactivos derivados de la clara de huevo.</i> .....	43
1.3.2. <i>Péptidos bioactivos derivados de la yema de huevo</i> .....	52
1.3.3. <i>Péptidos bioactivos derivados de la membrana de la cáscara de huevo</i> .....	54
1.3.4. <i>Marco legislativo para el desarrollo de alimentos funcionales. Los péptidos bioactivos como alimento funcional</i> .....	57
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>61</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>65</b>
3.1. OBTENCIÓN DEL HIDROLIZADO DE CLARA DE HUEVO CON PEPSINA .....	68
3.2. PROTOCOLO GENERAL DEL ESTUDIO EN RATAS .....	69
3.2.1. <i>Determinaciones y técnicas utilizadas en los estudios en ratas</i> .....	74
3.2.1.1. Estudio de la neuropatía diabética. Método de Von Frey .....	74
3.2.1.2. Medida de la presión arterial directa .....	75
3.2.1.3. Determinación de glucosa en plasma .....	76
3.2.1.4. Determinación de insulina en plasma .....	77
3.2.1.5. Determinación de malondialdehído en plasma .....	78
3.2.1.6. Determinación de colesterol y triglicéridos en plasma .....	78
3.2.1.7. Determinación de leptina y adiponectina en plasma .....	80
3.2.1.8. Medida de la capacidad antioxidante del plasma .....	80
3.2.1.9. Homogeneización y determinación de glutatión reducido en hígado.....	81
3.2.1.10. Estudios histológicos .....	82
3.2.2. <i>Evaluación de la expresión génica relativa mediante RT-qPCR</i> .....	84
3.2.3. <i>Cuantificación del contenido de mitocondrias en tejido adiposo interescapular</i> .....	86
3.3. PROTOCOLO DEL ESTUDIO DE INTERVENCIÓN EN HUMANOS .....	87



3.3.1. Selección de pacientes.....	89
3.3.1.1. Criterios de exclusión .....	90
3.3.2. Fase de intervención .....	92
3.3.3. Recogida de muestras y determinaciones realizadas a lo largo del estudio .....	93
3.3.3.1. Medida del perímetro abdominal .....	93
3.3.3.2. Medida de la presión arterial .....	94
3.3.3.3. Extracción de sangre y determinaciones bioquímicas .....	94
3.3.4. Criterios de retirada.....	95
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	95
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>97</b>
4.1. SELECCIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL DE OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA .....	99
4.2. EFECTO DEL CONSUMO DEL HIDROLIZADO DE CLARA DE HUEVO CON PEPSINA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE SÍNDROME METABÓLICO INDUCIDO POR DIETA .....	138
4.2.1. Efecto del consumo del hidrolizado de clara de huevo con pepsina sobre la ingesta y la composición corporal.....	140
4.2.2. Efecto del consumo del hidrolizado de clara de huevo con pepsina sobre el desarrollo de estrés oxidativo e inflamación .....	149
4.2.3. Efecto del consumo del hidrolizado de clara de huevo con pepsina sobre el metabolismo de la glucosa.....	154
4.2.4. Efecto del consumo del hidrolizado de clara de huevo con pepsina sobre el metabolismo lipídico .....	157
4.2.5. Efecto del hidrolizado de clara de huevo sobre tejidos implicados en el metabolismo energético. Análisis de la expresión de genes mediante RT-qPCR.....	160
4.3. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA Y SEGURIDAD DEL HIDROLIZADO DE CLARA DE HUEVO CON PEPSINA EN PACIENTES CON SÍNDROME METABÓLICO. ....	177
<b>5. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....</b>	<b>191</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>200</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>18S:</b> Subunidad ribosomal 18S	<b>HFCS:</b> Almidón de maíz con alto contenido en fructosa, Isoglucosa; <i>High fructose corn syrup</i>
<b>4-AF:</b> 4-aminofenazona	<b>HGNA:</b> Hígado graso no alcohólico
<b>AAPH:</b> 2,2'-azo-bis-(2-metilpropionamida)	<b>HOMA-IR:</b> Índice de resistencia a la insulina
<b>ACC:</b> Acetil CoA carboxilasa	<b>IECA:</b> Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina
<b>ACO:</b> Acetil CoA oxidasa	<b>IL-1<math>\beta</math>:</b> Interleuquina 1 beta
<b>ADNc:</b> ADN complementario	<b>IL-6:</b> Interleuquina 6
<b>ADNm:</b> ADN mitocondrial	<b>IMC:</b> Índice de masa corporal
<b>ADP:</b> Adenosina difosfato	<b>iNOS:</b> Óxido nítrico sintasa inducible
<b>ATP:</b> Adenosina trifosfato	<b>Lcad:</b> Acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga
<b>AUC:</b> Área bajo la curva	<b>LDL:</b> Lipoproteína de baja densidad
<b>CIDEA:</b> Activador de muerte celular CIDE-A	<b>LPL:</b> Lipoproteínlipasa
<b>Cox1:</b> Citocromo C oxidasa subunidad 1	<b>Mcad:</b> Acil-CoA dehidrogenasa de cadena media
<b>Cpt1B:</b> Carnitina palmitoiltransferasa 1b	<b>MCP-1:</b> Proteína quimiotáctica de macrófagos 1
<b>CycloA:</b> Ciclofilina A	<b>MDA:</b> Malondialdehído
<b>DAP:</b> Dihidroxiacetona fosfato	<b>Mfn2:</b> Mitofusina 2
<b>DIO:</b> Obesidad inducida por dieta; <i>Diet induced obesity</i>	<b>NO:</b> Óxido nítrico
<b>DM2:</b> Diabetes mellitus tipo 2	<b>NOS:</b> Óxido nítrico sintasa
<b>Dmn1L:</b> GTPasa similar a la dinamina 1	<b>Nrf1:</b> Factor de respiración nuclear 1
<b>ECA:</b> Enzima convertidora de angiotensina	<b>OMS:</b> Organización mundial de la salud
<b>EFSA:</b> Autoridad europea de seguridad alimentaria; <i>European food safety authority</i>	<b>OPA1:</b> Proteína de atrofia óptica 1
<b>EROs:</b> Especies reactivas de oxígeno	<b>ORAC:</b> Capacidad de absorción de radicales de oxígeno
<b>FABP4:</b> Proteína transportadora de ácidos grasos 4	<b>PAD:</b> Presión arterial diastólica
<b>FAS:</b> Ácido graso sintasa	<b>PAM:</b> Presión arterial media
<b>FC:</b> Frecuencia cardíaca	<b>PAS:</b> Presión arterial sistólica
<b>FDA:</b> Administración de alimentos y medicamentos de Estados Unidos; <i>U.S. food and drug administration</i>	<b>PCR:</b> Reacción en cadena de la polimerasa
<b>FID:</b> Federación internacional de diabetes	<b>Pdk4:</b> Piruvato deshidrogenasa quinasa 4
<b>G3P:</b> Glicerol-3-fosfato	<b>PGC1<math>\alpha</math>:</b> Coactivador 1 $\alpha$ de PPAR $\gamma$
<b>GK:</b> Glicerol quinasa	<b>PGC1<math>\beta</math>:</b> Coactivador 1 $\beta$ de PPAR $\gamma$
<b>GPO:</b> Glicerolfosfato oxidasa	<b>PPAR<math>\alpha</math>:</b> Receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa
<b>GPX3:</b> Glutación peroxidasa	<b>PRDm16:</b> Dominio PR 16, mitocondrial
<b>HDL:</b> Lipoproteína de alta densidad	

**qPCR:** PCR cuantitativa

**SHR:** Ratas espontáneamente hipertensas;  
*Spontaneously hypertensive rat*

**SREBP1c:** Proteína de unión al elemento  
regulador de esterol 1c

**TBA:** Ácido tiobarbitúrico

**Tfam:** Factor de transcripción A,  
mitocondrial

**Tfb2m:** Factor de transcripción 2B,  
mitocondrial

**TG:** Triglicéridos

**TNF $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa

**UCP1:** Termogenina

# RESUMEN

# ABSTRACT

## RESUMEN

El objetivo global de la presente Tesis Doctoral fue evaluar el efecto de la administración de un hidrolizado de clara de huevo con pepsina, previamente seleccionado por sus actividades *in vitro* e *in vivo* sobre algunas de las complicaciones asociadas al síndrome metabólico, en un modelo animal de obesidad inducida por dieta y en pacientes humanos con síndrome metabólico.

La primera parte del trabajo consistió en la búsqueda y selección del modelo animal de obesidad inducida por dieta, que reuniera el mayor número de alteraciones posibles asociadas al desarrollo del síndrome metabólico. Para ello, se administró durante 20 semanas a ratas Wistar, una dieta con alto contenido en grasa o una dieta con alto contenido en grasa combinada con la administración de elevadas cantidades de los azúcares más consumidos en la sociedad actual: fructosa o glucosa. En total, se establecieron cuatro grupos experimentales a los que se les administró una dieta sólida estándar y agua como bebida (C), una dieta hipergrasa y agua como bebida (DG), una dieta hipergrasa y una solución acuosa de fructosa al 25% como bebida (DGf) y una dieta hipergrasa con una solución acuosa de glucosa al 25% como bebida (DGg). Durante el estudio se evaluó el peso corporal, la ingesta sólida y líquida de los animales, así como el desarrollo de neuropatía periférica. Al finalizar el estudio se midió el perímetro abdominal de los animales. Posteriormente, los animales se sacrificaron, y se extrajeron muestras de sangre y de diferentes órganos y tejidos (hígado, tejido adiposo epididimal, tejido adiposo interescapular, tejido muscular y tibia). Los órganos se pesaron y se almacenaron para posteriores análisis bioquímicos y para estudios histológicos.

A la vista de los resultados obtenidos, se seleccionó el modelo experimental que recibió una dieta hipergrasa con una solución acuosa de glucosa al 25%, pues fue en ese grupo experimental en el que se concentraron el mayor número de alteraciones asociadas al síndrome metabólico. Los animales de este grupo aumentaron su peso corporal, su perímetro abdominal y el tamaño de los adipocitos del tejido adiposo epididimal. Estas ratas presentaron un estadio temprano de insulinoresistencia con presencia de neuropatía sensorial y un aumento de los marcadores de estrés oxidativo

e inflamación. Los análisis realizados en el tejido adiposo pardo de estos animales indicaron además la existencia de un deterioro de los mecanismos de reparación y biogénesis mitocondrial.

A continuación, se evaluó el efecto del consumo de un hidrolizado de clara de huevo con pepsina sobre el desarrollo de síndrome metabólico y sus complicaciones asociadas en el modelo experimental seleccionado en el estudio anterior (DGg). En este estudio se evaluó además la posible aparición de efectos adversos tras la administración del hidrolizado en animales sanos. Para ello, se administró a un grupo de animales durante 20 semanas una dieta sólida estándar y agua como bebida y, a partir de la semana 9 y hasta finalizar el estudio, se le administró 1g/kg·día de hidrolizado de clara de huevo en el agua de bebida (CH). Al otro grupo de animales se le administró durante 20 semanas una dieta hipergrasa con una solución acuosa de glucosa al 25% como bebida y, de la misma forma que en el grupo anterior, a partir de la semana 9 y hasta finalizar el estudio, a este grupo también se le administró 1g/kg·día de hidrolizado de clara de huevo en el agua de bebida (DGgH). Durante el estudio se evaluó el peso y la ingesta de los animales, así como el desarrollo de neuropatía periférica. Al finalizar el estudio se midió el perímetro abdominal de los animales. Posteriormente, los animales se sacrificaron, y se extrajeron muestras de sangre y de los órganos para posteriores análisis bioquímicos e histológicos similares a los llevados a cabo durante el primer estudio experimental.

El consumo de hidrolizado de clara de huevo con pepsina redujo el aumento de peso corporal, el perímetro abdominal y el tamaño de los adipocitos del tejido adiposo epididimal. Los animales del grupo DGgH presentaron una disminución de los niveles de malondialdehído y un aumento de la capacidad antioxidante del plasma, además de normalizar los niveles de glutatión reducido en el hígado. La administración del hidrolizado de clara de huevo con pepsina consiguió disminuir la hiperglucemia y la hiperinsulinemia, y logró revertir el desarrollo de neuropatía periférica. El tejido adiposo pardo de los animales del grupo DGgH mostró un aumento de la expresión de genes oxidativos tales como PPAR $\alpha$ , Mcad, Lcad y Cpt1B, y de genes implicados en la biogénesis mitocondrial (PGC1 $\beta$ , MFN2, Tfb2m), y presentaron además un aumento de

la cantidad de mitocondrias y de la expresión de los genes termogénicos UCP1 y PRDm16 en el tejido adiposo pardo.

Finalmente, en esta Tesis Doctoral se evaluó la eficacia y seguridad del consumo del hidrolizado de clara de huevo con pepsina en sujetos humanos con síndrome metabólico. Para ello, se diseñó un estudio de intervención de 14 semanas de duración, doble ciego, aleatorio y controlado con placebo. El tratamiento de hidrolizado de clara de huevo con pepsina o de placebo se administró en una dosis de 4g/día como un liofilizado. Se realizó un seguimiento periódico de los pacientes para evaluar su estado de salud en los que se midió su perímetro abdominal, su peso corporal y su presión arterial. Se recogieron además muestras de sangre al inicio, en medio del estudio y al finalizar para la realización de análisis bioquímicos generales. Concretamente, se evaluaron las concentraciones plasmáticas de glucosa, insulina, triglicéridos, colesterol total, colesterol HDL y colesterol LDL.

La administración de 4g diarios del hidrolizado de clara de huevo con pepsina no provocó efectos adversos en ninguno de los participantes durante el tiempo que se prolongó el estudio de intervención, por lo que su consumo puede considerarse seguro para los humanos. La administración del hidrolizado de clara de huevo con pepsina fue capaz además de mejorar algunos de los parámetros cardiometabólicos, monitorizados durante el estudio en aquellos participantes que los presentaban alterados. No se observaron sin embargo, disminuciones en el peso corporal o en el perímetro abdominal de los participantes.

En conjunto, el hidrolizado de clara de huevo con pepsina podría utilizarse como ingrediente para desarrollar alimentos funcionales útiles en la prevención y/o tratamiento de algunas de las alteraciones asociadas con el desarrollo de obesidad y/o de síndrome metabólico. Sin embargo, serán necesarios más estudios en animales de experimentación que nos permitan profundizar y establecer el mecanismo de acción del hidrolizado de clara de huevo, y también serán necesarios más estudios de intervención para demostrar claramente sus efectos beneficiosos sobre el ser humano, si se quiere finalmente proceder a la comercialización de este hidrolizado.

## ABSTRACT

The main objective of the present Doctoral Thesis was to evaluate the effect of the administration of a previously selected pepsin egg white hydrolysate for the treatment of some complications related to metabolic syndrome, tested in an experimental model of diet induced obesity and clinically tested in patients with metabolic syndrome.

The first stage of the work consisted on the selection of a diet induced obesity animal model, in which most of the alterations related with the development of metabolic syndrome occurred. To do this, Wistar rats received during 20 weeks a high-fat or a high-fat-high-sugar diet. Two of the most consumed sugars in the actual society were used during the model selection: fructose and glucose. The animals were divided in four experimental groups, which consumed during the experimental period: Standard diet and water as drinking fluid (C), high-fat diet and water as drinking fluid (DG), high-fat diet and a 25% fructose solution as drinking fluid (DGf), and high-fat diet and a 25% glucose solution as drinking fluid (DGg). Body weight, solid intake and liquid intake were recorded during the study. Peripheral neuropathy development was also evaluated during the experimental period. At the end of the study, animals were sacrificed and different organs (liver, epididymal adipose tissue, interscapular adipose tissue, muscular tissue and tibia) and blood samples were collected. All samples were stored for later biochemical and histological analyses.

Regarding the results of this first study, the experimental model receiving a high-fat-high-glucose diet (DGg) was selected. This animal group developed most of the alterations related to metabolic syndrome. These animals increased their body weight, their waist circumference and the adipocyte size from the epididymal adipose tissue. This animal also group developed an early stage of insulin resistance combined with sensory neuropathy development, as well as an increase in oxidative stress and inflammation biomarkers. In addition, analyses performed on interscapular adipose tissue samples showed a worsening in mitochondrial repair and biogenesis.

Subsequently, the effect of the pepsin egg white hydrolysate consumption in the treatment of metabolic syndrome and its related complications was evaluated in



the high-fat-high-glucose animal model (DGg) selected in the previous stage. In this study the occurrence of adverse effects in healthy animals after egg white hydrolysate was also evaluated. Animals were divided in two experimental groups which received, during 20 weeks: Standard diet and water, as well as 1g/kg-day of egg white hydrolysate in the drinking water from the week 9 to the end of the study (CH); High-fat diet and a 25% glucose solution, as well as 1g/kg-day egg white hydrolysate in the drinking water from the week 9 to the end of the study (DGgH). During the study body weight, solid and fluid intake and peripheral neuropathy development were evaluated. At the end of the study, waist circumference was measured. Finally, animals were sacrificed and blood and organ samples were collected for later biochemical and histological analyses. These analyses were similar to those performed in the first experimental study.

Pepsin egg white hydrolysate intake reduced body weight gain, waist circumference and adipocyte size from the epididymal adipose tissue. DGgH animals reduced malondialdehyde plasma levels and increased their plasma antioxidant capacity. Reduced glutathione levels in liver were also normalized in this group. Pepsin egg white hydrolysate administration reduced the hyperglycemia and hyperinsulinemia, and improved the peripheral neuropathy developed in this animal group. Brown adipose tissue from DGgH animals showed an overexpression of oxidative genes such as PPAR $\alpha$ , Mcad, Lcad and Cpt1B, and genes related with mitochondrial biogenesis (PGC1 $\beta$ , MFN2, Tfb2m). Furthermore, these animals increased mitochondrial content and overexpressed thermogenic genes UCP1 and PRDm16 in brown adipose tissue.

Finally, in this Doctoral Thesis, the efficacy and safety of the pepsin egg white hydrolysate consumption was evaluated in human subjects with diagnosis of metabolic syndrome. For this, a 14 weeks double blind, randomized, placebo controlled clinical trial was performed. Pepsin egg white hydrolysate or placebo treatments were administered lyophilized using a 4 g/day dosage. Patients were checked periodically in order to evaluate their health status; waist circumference, body weight and blood pressure were measured. At beginning, middle time and at the end of the study, blood

samples were collected for measurement of serum levels of glucose, insulin, triglycerides, total cholesterol, HDL cholesterol and LDL cholesterol were determined.

Daily, 4 g of pepsin egg white hydrolysate consumption did not cause any adverse effects to any volunteer during the intervention period, thus pepsin egg white hydrolysate intake can be considered safe for humans. In addition, pepsin egg white hydrolysate administration was able to ameliorate some of the altered cardiometabolic parameters evaluated during this trial, in those volunteers who presented alterations at the beginning of the trial. However, lowering of body weight or waist circumference was not observed during the study.

In summary, pepsin egg white hydrolysate could be used as a potential ingredient to develop new functional foods, useful to prevent and/or treat some of the alterations related to obesity and/or metabolic syndrome development. However, more animal studies would be necessary to deepen and clarify the pathways by which the pepsin egg white hydrolysate exerts its physiological activity. Besides, more clinical trials would be necessary to confirm its beneficial effects on human beings, before commercialization of this product can be reached.

# 1

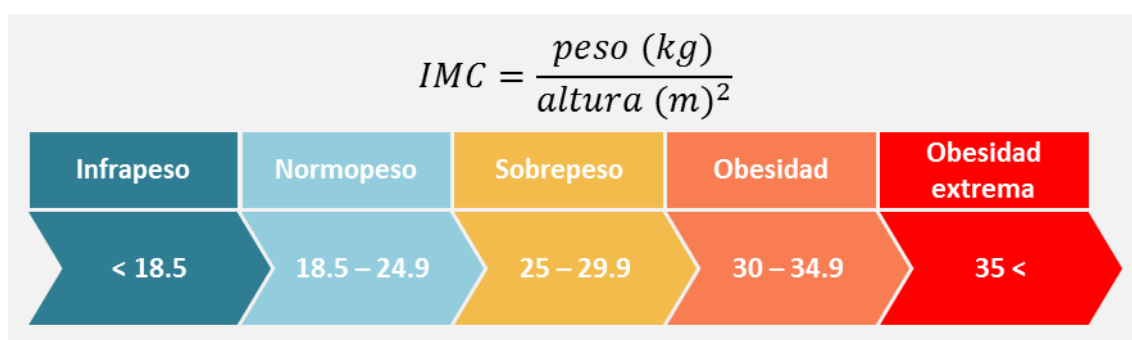
## INTRODUCCIÓN

### **1.1. Obesidad. Concepto, fisiopatología y complicaciones asociadas**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la obesidad como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud (World Health Organization, 2016). La prevalencia de esta patología ha aumentado de forma drástica en las últimas décadas, siendo declarada pandemia global en el año 2011 (Swinburn *et al.*, 2011). En el año 2014, alrededor del 39% de la población adulta a nivel mundial se encontraba en situación de sobrepeso, y que el 13% de la población mundial era obesa (World Health Organization, 2016). Sólo en España, la prevalencia de sobrepeso y obesidad durante el año 2017 fue del 54.5% en adultos y del 34.2% en niños menores de 10 años (Encuesta Nacional de Salud de España, 2017). Aunque se sabe que las condiciones genéticas individuales influyen, la “occidentalización” del estilo de vida se considera la principal causa del aumento de la incidencia de obesidad. Esta occidentalización, causada por los cambios socioeconómicos producidos durante los últimos años en países desarrollados, ha supuesto importantes modificaciones en los hábitos de alimentación, así como una reducción del gasto energético diario debido al aumento del sedentarismo (Swinburn *et al.*, 2011). En los últimos años han surgido además otras complicaciones relacionadas con este aumento de la prevalencia de obesidad, como la normalización de esta condición en la población, situación que provoca que incluso los profesionales sanitarios experimenten mayores dificultades para reconocer el sobrepeso en sus pacientes, lo que supone un retraso en la aplicación de tratamientos preventivos, especialmente aquellos encaminados a la pérdida de peso (Robinson, 2017).

La obesidad está causada principalmente por un desequilibrio continuado entre la energía consumida a través de los alimentos y la energía gastada. Se identifica habitualmente mediante el cálculo del Índice de Masa Corporal (IMC) (Figura 1), y se considera sobrepeso cuando un individuo presenta valores de IMC superiores a 24.9 y obesidad cuando los valores son superiores a 30. Existen otros factores tales como los niveles de grasa corporal y la distribución corporal de dicha adiposidad que deben ser también tenidos en cuenta a la hora de predecir las posibles alteraciones y complicaciones derivadas de este desorden (Aydin *et al.*, 2014; Schrover *et al.*, 2016;

Barone *et al.*, 2017; Seo *et al.*, 2017). Los pacientes obesos tienen además un mayor riesgo de padecer enfermedades y alteraciones cada vez más habituales en nuestro entorno, tales como diabetes mellitus tipo 2 (DM2), dislipemia, enfermedad renal crónica, hipertensión, infarto, demencia, hígado graso no alcohólico (HGNA), migraña, sarcopenia, cáncer, etc. (Peña García-Orea *et al.*, 2013; Barone *et al.*, 2017; Cohen, 2017; GBD 2015 Obesity Collaborators, 2017; Pavlovic *et al.*, 2017). De hecho, la presencia de sobrepeso se asocia con un 7.1% de las muertes y un 4.9% de las discapacidades que se producen anualmente en todo el mundo (Cohen, 2017). Todo ello conlleva un aumento importante del gasto sanitario. Tanto es así que ya en 1999 se estimó un gasto sanitario global del 6.9% sólo en el tratamiento de la obesidad y sus alteraciones asociadas.



**Figura 1.** Fórmula para calcular el Índice de Masa Corporal (IMC) y clasificación del estado ponderal en base al IMC.

La obesidad y sus enfermedades relacionadas son patologías que podrían ser fácilmente prevenibles mediante la aplicación de una dieta adecuada y la implantación de ejercicio físico moderado. En este sentido, durante la infancia, y especialmente los primeros 5 años de vida, se consideran un periodo esencial para establecer y consolidar hábitos de vida saludables (Bibiloni *et al.*, 2017), ya que existe una alta probabilidad de que un niño obeso continúe siéndolo en la etapa adulta (Galicia Martín y Simal Antón, 2002; Black *et al.*, 2017). Se considera como resultado positivo de estos estudios de intervención cuando se produce una reducción significativa del IMC de los niños participantes, y estos estudios han demostrado presentar una efectividad inmediata media del 45% (Bibiloni *et al.*, 2017). Por ello, los planes de prevención de la obesidad infantil deberían formar parte de las estrategias de intervención destinadas a

la reeducación de nuestra sociedad hacia hábitos de vida más saludables (Pereira-da-Silva *et al.*, 2016; Bibiloni *et al.*, 2017; Black *et al.*, 2017). Otra política de acción sugerida consistiría en facilitar la disponibilidad y el acceso a la comida considerada saludable (legumbres, frutas, verduras y alimentos no procesados) y limitar el acceso a alimentos procesados y/o con alto contenido en sal, grasas o azúcares. También sería conveniente regular la publicidad que se realiza sobre los alimentos procesados con el fin de disminuir la incorporación de éstos a nuestra dieta habitual (Swinburn *et al.*, 2011), y limitar además la cantidad de azúcar de aquellos alimentos que están destinados al consumo infantil, especialmente los refrescos y los zumos azucarados, consumidos con frecuencia por este grupo de población. Todo ello nos lleva, en definitiva, a educar desde edades tempranas en el patrón alimentario establecido en nuestra Dieta Mediterránea.

Las características principales de la Dieta Mediterránea, y que la diferencian de las dietas existentes en otras culturas, son el elevado consumo de frutas, verduras, pescado y el bajo consumo de grasas saturadas, debido principalmente al uso de aceite de oliva virgen o virgen extra como grasa de elección en la extensa variedad de elaboraciones culinarias que componen el recetario mediterráneo (Toledo *et al.*, 2015). A lo largo de los años, se han realizado numerosos estudios en los que se ha conseguido demostrar que en países mediterráneos como Grecia, España, Italia y Francia donde la ingesta de verduras, hortalizas, frutas, cereales, legumbres y aceite de oliva es mayor, existe un aumento de la esperanza de vida mucho mayor que en otros países como Holanda, Finlandia, Estados Unidos o Japón (Carbajal y Ortega, 2011). En los últimos años, se ha relacionado también la Dieta Mediterránea con una menor incidencia y prevalencia de sobrepeso y obesidad en la población infantil y adulta (Pérez-López *et al.*, 2009). Sin embargo, y a pesar de los muchos beneficios que nos aporta la Dieta Mediterránea, recientemente se ha observado que la población española se está alejando de este modelo alimentario, y son numerosos los estudios que han demostrado que los españoles ingieren cada vez más grasas y menos hidratos de carbono complejos, lo que ha ocasionado un importante descenso en la ingesta de fibra, de compuestos bioactivos y de antioxidantes (Varela-Moreiras *et al.*, 2013). En este contexto, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria lanzó en el año 2005 la

estrategia para la nutrición, actividad física y prevención de la obesidad (Estrategia NAOS) que tiene como finalidad primordial la promoción y la protección de la salud española mediante la creación de un entorno favorable que permita aumentar los hábitos de vida saludables y la promoción de la Dieta Mediterránea, para intentar reducir con ello el aumento de las cifras de obesidad en la población española (Agencia Española de Seguridad Alimentaria, 2005). Esta estrategia pretende impulsar todas aquellas iniciativas que contribuyan a lograr un cambio social en la promoción de una alimentación saludable y en la prevención del sedentarismo, prestando especial atención al colectivo infantil tanto en el ámbito familiar como en el ámbito escolar.

En pacientes con obesidad, tanto en la etapa infantil como en la edad adulta, el tratamiento más habitual y que se instaura en primer lugar tiene como objetivo la reducción de la grasa corporal a través de la instauración de un balance energético negativo. La incorporación de una dieta hipocalórica, combinada con un aumento de la actividad física suele ser el primer paso en el tratamiento del paciente obeso. Con este tipo de intervenciones se pretende conseguir una reducción de peso que, en los individuos adultos, suele representar entre el 6 y el 10% en un plazo de 6 meses (Kushner, 2014). Sin embargo, y a pesar de que en la actualidad este tipo de tratamientos se personalizan para conseguir una mayor adherencia de los pacientes a este nuevo estilo de vida, en muchos casos a los pacientes les resulta imposible seguir y afianzar estos nuevos hábitos de manera prolongada y se hace necesario el apoyo psicológico para modificar la conducta alimentaria de los pacientes (Galicia Martín y Simal Antón, 2002). Lamentablemente, aunque una gran mayoría de los pacientes obesos consigue perder peso en un plazo de tiempo relativamente corto, el mantenimiento del nuevo peso corporal a largo plazo es poco probable. La mayoría de los pacientes ganan peso lentamente hasta recuperar el peso inicial y, en algunos casos, llegan incluso a superarlo (Galicia Martín y Simal Antón, 2002).

En los casos en los que el paciente no consigue reducir su peso mediante un cambio de su estilo de vida y su alimentación, se sugiere la instauración de un tratamiento farmacológico. En la actualidad se estudian una gran cantidad de compuestos que, en combinación con una dieta hipocalórica, podrían ayudar a la reducción de peso y, aunque algunos de ellos están aprobados por la Administración

de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) (Tabla 1), en España sólo existe un fármaco aprobado por el Ministerio de Sanidad para el tratamiento de la obesidad: el Orlistat. El mecanismo de acción de este fármaco consiste en unirse a las lipasas gástricas y pancreáticas, inhibir su actividad e impedir la escisión de los ácidos grasos de los triglicéridos de la dieta limitando con ello su absorción en el intestino. El consumo de Orlistat junto con los alimentos es capaz de inhibir hasta un 30% la absorción de los ácidos grasos ingeridos en la dieta (Galicia Martín y Simal Antón, 2002).

**Tabla 1:** Fármacos aprobados actualmente en Estados Unidos para el tratamiento de la obesidad. Tomado de [www.fda.gov](http://www.fda.gov) (Octubre de 2017).

Fármaco	Mecanismo de acción	Efecto	Fecha de aprobación
Orlistat	Inhibición de lipasas gástricas y pancreáticas	Limita la absorción de ácidos grasos en el intestino	1999
Lorcaserina	Agonista selectivo del receptor 5-HT <sub>2C</sub>	Estimula la señal de saciedad y reduce el apetito	2012
Fentermina/ Topiramato	La fentermina estimula la secreción de noradrenalina. El topiramato antagoniza los receptores AMPA en el sistema nervioso	Estimula el gasto calórico y la termogénesis. Reduce la ansiedad por la comida y otros comportamientos adictivos	2012
Liraglutida	Agonista de receptores de péptido similar al glucagón tipo 1	Estimula la secreción de insulina por el páncreas, ralentiza el vaciado gástrico y estimula la sensación de saciedad	2014
Bupropión/ Naltrexona	El bupropión inhibe la recaptación de dopamina y noradrenalina en el cerebro. La naltrexona actúa como antagonista de los receptores opioides	Reduce el apetito e inhibe el sistema de recompensa activado por el consumo de alimentos	2014

Receptor 5-HT<sub>2C</sub>: Receptor de 5-hidroxitriptamina 2C; Receptores AMPA: Receptor de ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico.

Cuando los tratamientos anteriormente mencionados no son efectivos, y únicamente en casos especiales, se puede recurrir a tratamientos quirúrgicos como la



cirugía bariátrica. Estos tratamientos están especialmente dirigidos a pacientes adultos con un IMC superior a 35 y con riesgo de sufrir morbilidades asociadas a la obesidad, como patologías cardiopulmonares o DM2. Con este tipo de tratamientos los pacientes consiguen una pérdida de peso de entre un 20 y un 30% respecto al peso inicial en un plazo de 5 años (Galicia Martín y Simal Antón, 2002; Kushner, 2014).

Por otro lado, es importante tener en cuenta que en los pacientes obesos, el problema no radica solo en la obesidad en sí misma, sino también en la gran cantidad de problemas y/o complicaciones cardiometabólicas que se asocian a ella y que no siempre son capaces de revertirse en su totalidad tras los tratamientos de pérdida de peso (Swinburn *et al.*, 2011; Kushner, 2014; Grundy, 2015; Grundy, 2016). En aquellos casos en los que el paciente no consiga una pérdida de peso suficiente o esta reducción de peso corporal no haya conseguido revertir las alteraciones desarrolladas, será necesario instaurar un tratamiento farmacológico para controlarlas. Para ello, será necesario tratar cada una de estas alteraciones de manera individual, por lo que inevitablemente se deberá administrar una polimedicación, lo que aumenta el riesgo de que se produzcan interacciones entre los fármacos, con los efectos secundarios que esto conlleva (Grundy, 2015).

### **1.1.1. Alteraciones asociadas a la obesidad: El Síndrome Metabólico y los mecanismos implicados en su desarrollo**

El síndrome metabólico se define como una enfermedad multifactorial en la que coexisten alteraciones de riesgo cardiometabólico tales como obesidad abdominal, insulinoresistencia, intolerancia a la glucosa, dislipemia y/o hipertensión (Aydin *et al.*, 2014; Grundy 2015; Grundy, 2016). Al coexistir varias alteraciones cardiometabólicas en un mismo individuo, esta condición incrementa notablemente el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y aumenta hasta cinco veces las probabilidades de padecer DM2 (Grundy, 2016). Debido a esto, el síndrome metabólico se está convirtiendo en un problema de salud pública muy importante cuya prevalencia está aumentando de manera alarmante en todo el mundo, especialmente

en áreas económicas emergentes (Aydin *et al.*, 2014). En la actualidad, se calcula que entre un 30 y un 50% de la población mundial está diagnosticada de síndrome metabólico, y hay que señalar que la mayoría de estos individuos presentan obesidad o sobrepeso (Andersen y Fernández, 2013; Grundy, 2015).

Las cifras de prevalencia de síndrome metabólico podrían ser incluso mayores, ya que, a día de hoy, no existe un criterio unificado para el correcto diagnóstico de este síndrome (Aydin *et al.*, 2014). Uno de los últimos criterios, y el más utilizado para diagnosticar el síndrome metabólico en la actualidad, fue el propuesto en el año 2006 por la Federación Internacional de Diabetes (FID). Este documento trató de fijar las bases para el diagnóstico del síndrome metabólico estableciendo la obesidad abdominal como uno de los principales factores causantes de este síndrome y, por tanto, un requisito indispensable para el diagnóstico de la enfermedad (International Diabetes Federation, 2006). En la Tabla 2 se muestran los criterios propuestos por la FID para realizar el diagnóstico del síndrome metabólico.

**Tabla 2.** Criterios propuestos por la Federación Internacional de Diabetes (FID) para realizar el diagnóstico del síndrome metabólico (International Diabetes Federation, 2006). PAD: Presión arterial diastólica, PAS: Presión arterial sistólica.

De acuerdo con la definición establecida por la FID, para realizar el diagnóstico de síndrome metabólico, el paciente debe presentar: <b>Obesidad abdominal</b> (circunferencia abdominal $\geq 94$ cm en hombres y $\geq 80$ cm en mujeres) <u>más</u> dos factores de entre los indicados a continuación:	
Triglicéridos elevados	$\geq 150$ mg/dL (1.7 mmol/L)
Colesterol HDL reducido	$< 40$ mg/dL (1.03 mmol/L) en hombres $< 50$ mg/dL (1.29 mmol/L) en mujeres
Presión arterial elevada	PAS $\geq 130$ mmHg o PAD $\geq 85$ mmHg
Niveles de glucosa en ayunas elevados	$\geq 100$ mg/dL (5.6 mmol/L)

La etiología y los mecanismos por los cuales se produce la aparición y el desarrollo del síndrome metabólico no son del todo conocidos. Sin embargo, dada la influencia que la obesidad parece tener en el desarrollo de este síndrome, existe un consenso científico que establece el origen de esta patología en el tejido adiposo blanco, principalmente en el denominado tejido adiposo visceral por sus características metabólicas y funcionales (Raimundo y Lopes, 2011; Emanuela *et al.*, 2012; Grundy, 2015; Ellulu, 2017). Entre las múltiples líneas de investigación que se están llevando a cabo sobre el tejido adiposo blanco y su influencia en el desarrollo del síndrome metabólico, existen numerosos estudios que han establecido la disfunción de este tejido como el evento principal que termina provocando el resto de las alteraciones mencionadas (Lee *et al.*, 2014; Fasshauer y Blüher, 2015; Grundy, 2015; Grundy, 2016; Schrover *et al.*, 2016; Badimon y Cubedo 2017). Es por ello que el siguiente apartado de esta Tesis Doctoral se centra en intentar explicar el mecanismo por el que la disfunción del tejido adiposo es la causa de las alteraciones y/o las complicaciones que se asocian con este síndrome.

### *1.1.1.1. La disfunción del tejido adiposo como causa de alteraciones metabólicas*

El tejido adiposo es el principal órgano de reserva energética del organismo. En él se almacena el exceso de energía consumida en forma de triglicéridos (TG), energía que se moviliza y se libera al torrente sanguíneo en forma de ácidos grasos y TG en momentos de demanda energética. Las alteraciones de esta función provocan la acumulación de ácidos grasos en otros tejidos y órganos periféricos como el músculo o el hígado. Este fenómeno, denominado “acumulación ectópica de lípidos”, es potencialmente tóxico para los órganos en que se produce ya que dificulta y deteriora su funcionalidad (Lee *et al.*, 2014; Grundy, 2016). El tejido adiposo cumple, por tanto, una función protectora de los órganos muy importante para hacer frente a la lipotoxicidad producida por los ácidos grasos. Por todo ello es necesario mantener la correcta funcionalidad de este tejido para evitar así las alteraciones metabólicas que ocasiona la aparición y el desarrollo de la obesidad (Luo y Liu, 2016).

El tejido adiposo se clasifica tradicionalmente en dos grupos bien diferenciados en base a su funcionalidad: el tejido adiposo pardo y el tejido adiposo blanco.

El tejido adiposo pardo posee una morfología multilocular, con un alto contenido en mitocondrias. Es un tejido especializado en la oxidación de ácidos grasos y en la generación de calor gracias a la presencia de termogenina (UCP1, por sus siglas en inglés *UnCoupling Protein 1*) en la membrana interna mitocondrial. Es el tejido adiposo encargado de la denominada “termogénesis no asociada a temblor”. Aunque se pensaba que el ser humano sólo poseía depósitos de tejido adiposo pardo durante el primer año de vida, posteriormente se comprobó que los seres humanos adultos conservan pequeños depósitos de este tejido en la región supraclavicular, en la región cervical y en la región perirrenal (Scheele y Nielsen, 2017).

El tejido adiposo blanco, por el contrario, tiene como funciones principales la de reserva y la regulación de la homeostasis energética del organismo. Es el tejido adiposo más abundante en el ser humano y, por tanto, el principal tejido adiposo implicado en el desarrollo de obesidad. En este tejido, principalmente compuesto por adipocitos, los TG almacenados se localizan en una gran gota lipídica que ocupa la mayor parte de la célula. El contenido en mitocondrias de estos depósitos es mucho menor y también lo es su actividad oxidativa (Lee *et al.*, 2014; Luo y Liu, 2016). Aunque inicialmente se pensaba que la función de este tejido era únicamente el almacenaje energético, posteriormente se comprobó que el tejido adiposo blanco ejerce una función muy importante como órgano endocrino mediante la secreción de adipocitoquinas que participan en la regulación y distribución de la grasa corporal, en las señales de apetito y de saciedad, y también en las vías de señalización de secreción y sensibilidad a la insulina, entre otras (Fasshauer y Blüher, 2015). El tejido adiposo blanco se caracteriza además por tener una elevada plasticidad y es capaz de sufrir una expansión masiva o reducirse en respuesta al balance energético alterado (Badimon y Cubedo, 2017).

Según la distribución del tejido adiposo blanco en el cuerpo humano, la obesidad se clasifica en dos subtipos:

- Obesidad central o androide. Este tipo de obesidad se caracteriza por un predominio de tejido adiposo en la región abdominal y es más común en los hombres. Este fenotipo también se es común en las mujeres tras la etapa de menopausia, como consecuencia de una redistribución de la grasa provocada por la pérdida de estrógenos y progesterona (Kautzky-Willer *et al.*, 2016; Muka *et al.*, 2017).
- Obesidad ginoide. Este tipo de obesidad se caracteriza por la acumulación de tejido adiposo principalmente en la región fémoro-glútea y es más común en las mujeres en edad fértil (Kautzky-Willer *et al.*, 2016; Muka *et al.*, 2017).

Las personas con obesidad de tipo androide son más susceptibles de padecer síndrome metabólico que aquellas personas que presentan una distribución ginoide de su grasa corporal. Esto se debe a que el tejido adiposo localizado en la región abdominal está compuesto por depósitos grasos principalmente de tipo visceral, más activo en la producción de adipocitoquinas, causantes de una gran parte de las alteraciones metabólicas asociadas a la condición de obesidad, mientras que el tejido adiposo localizado en la región fémoro-glútea está compuesto por depósitos grasos principalmente de tipo subcutáneo (Grundey, 2015). Por este motivo, de forma general se señala que los hombres tienen un mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares que las mujeres (Kautzky-Willer *et al.*, 2016).

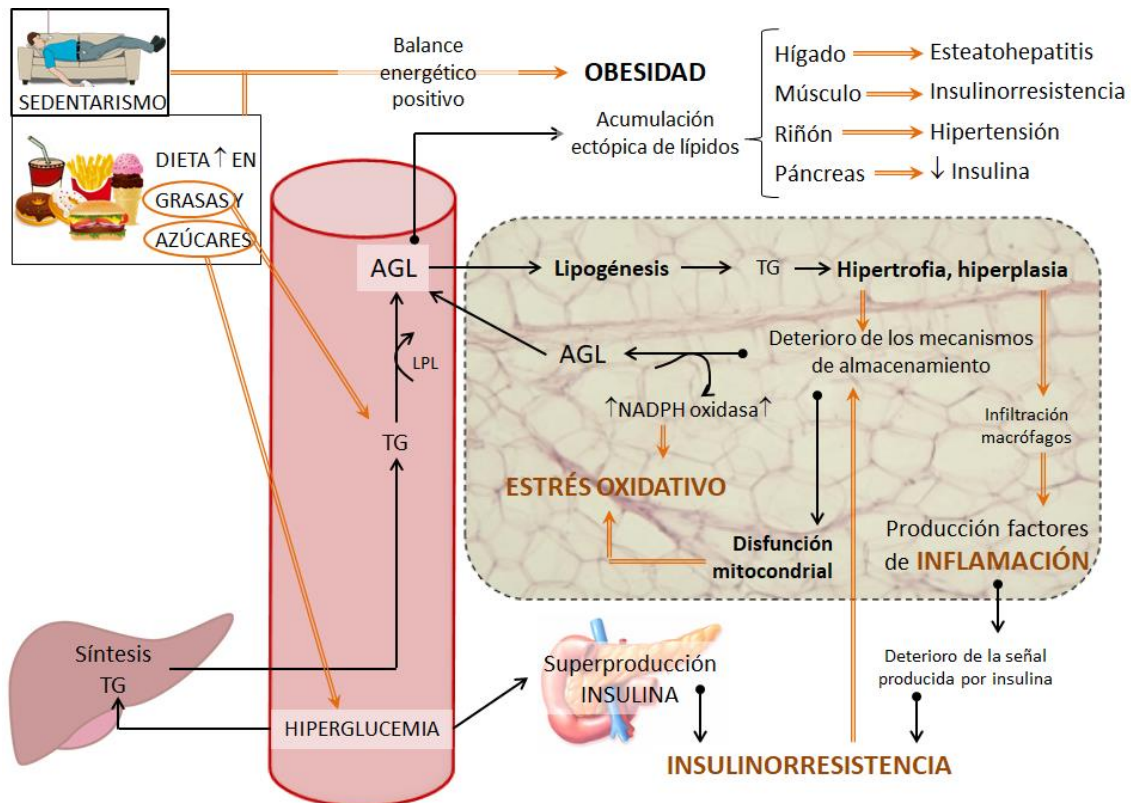
Para cumplir su función de reservorio energético, el tejido adiposo blanco sigue dos vías de señalización bien diferenciadas que pueden o no ser simultáneas:

- Hiperplasia. Consiste en la estimulación de la adipogénesis, de manera que se estimula la diferenciación de nuevos adipocitos.
- Hipertrofia. Consiste en la estimulación del crecimiento de los adipocitos sin incrementar el número de células activas.

Ante un consumo excesivo y continuado de energía, como ocurre durante el desarrollo de obesidad, el tejido adiposo estimula ambas vías de señalización (Engin, 2017). La estimulación de las vías de hiperplasia e hipertrofia llevan además asociada la estimulación de la vascularización del tejido, proceso denominado angiogénesis. Ambos procesos (adipogénesis y angiogénesis) deben realizarse de manera simultánea

para facilitar la vascularización del tejido adiposo y asegurar el correcto funcionamiento de los adipocitos. Sin embargo, en situaciones de obesidad, estos procesos se desequilibran: la vascularización no es suficiente para nutrir a los adipocitos y como consecuencia el tejido adiposo pierde capacidad de expansión. Los adipocitos se hipertrofian y comienzan entonces a sufrir una hipoxia y algunos se preparan o inician la maquinaria intracelular responsable de la apoptosis (Trayhurn *et al.*, 2008; Lafontan, 2014; Engin, 2017). El inicio del proceso de apoptosis supone la señalización de vías inflamatorias, el reclutamiento de macrófagos hacia el tejido adiposo blanco, un aumento del estrés oxidativo y, en último término, el desarrollo de insulinoresistencia y finalmente la aparición de DM2. La hipertrofia de los adipocitos supone además una menor sensibilidad a la insulina por parte de éstos y el inicio de las vías lipolíticas de liberación de ácidos grasos al torrente sanguíneo. Esto, unido a la capacidad reducida del tejido adiposo para expandirse conlleva la acumulación ectópica de los ácidos grasos y TG del torrente sanguíneo en otros tejidos y órganos no adiposos, provocando diversas alteraciones derivadas de su lipotoxicidad, tales como HGNA (ácidos grasos y TG se acumulan en el hígado) o aterosclerosis (ácidos grasos y TG se acumulan en las arterias) (Lafontan, 2014; Fasshauer y Blüher, 2015; Grundy, 2016; Schrover *et al.*, 2016; Badimon y Cubedo, 2017; Engin, 2017). En la Figura 2 se representan de manera simplificada los procesos que contribuyen al desarrollo del síndrome metabólico.

A continuación se describen de forma breve las alteraciones metabólicas que se producen durante el desarrollo del síndrome metabólico.



**Figura 2.** Esquema simplificado en que se representan los mecanismos implicados en la disfunción del tejido adiposo blanco y el desarrollo de síndrome metabólico. AGL: Ácidos grasos libres; LPL: Lipoproteínlipasa; NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; TG: Triglicéridos.

#### 1.1.1.2. Inflamación

Como hemos explicado con anterioridad, el tejido adiposo blanco se considera en la actualidad un órgano endocrino, implicado en la regulación de diferentes vías de señalización relacionadas con el apetito y la saciedad, la distribución de la adiposidad, la secreción de insulina y la función endotelial (Kuroda y Sakaue, 2017). El tejido adiposo blanco ejerce además su función endocrina mediante la liberación sistémica de moléculas bioactivas denominadas adipocitoquinas (Fasshauer y Blüher, 2015; Luo y Liu, 2016). Hasta la fecha se han identificado alrededor de 50 adipocitoquinas con múltiples funciones metabólicas y endocrinas, aunque la función completa de cada una de ellas está todavía por esclarecer (Tabla 3) (Stolarczyk, 2017). Entre las adipocitoquinas más importantes liberadas por el tejido adiposo blanco, y que se encuentran estrechamente relacionadas con el estado de obesidad, destacan la leptina y la adiponectina (Fasshauer y Blüher, 2015; Stolarczyk, 2017).

**Tabla 3:** Adipocitoquinas identificadas en el tejido adiposo blanco y sus funciones fisiológicas. Extraída, traducida y modificada de Fasshauer y Blüher (2015).

Adipocitoquina	Acciones principales
Adiponectina	Mejora la sensibilidad a insulina; acción antidiabética, antiaterogénica y antiinflamatoria
Adipsina	Activa la vía alternativa de señalización del complemento
Proteína similar a la Angiopoyetina 8	Promueve la proliferación de células $\beta$ pancreáticas; mejora la tolerancia a la glucosa
Apelina	Inhibe la secreción de insulina en el páncreas
BMP-4	Regula la función y la diferenciación de las células precursoras de adipocitos
BMP-7	Estimula la proliferación de adipocitos pardos; actúa reduciendo la ingesta de comida y aumentando el gasto energético
Catepsinas S, L, K	Regulan el metabolismo de la glucosa y la masa de tejido adiposo blanco.
Quemerina	Proteína de atracción; regula la adipogénesis
Clusterina	Promueve la progresión de tumores y la angiogénesis
DPP-IV	Degrada e inhibe GIP y GLP-1; inhibe la secreción de insulina en páncreas y aumenta los niveles plasmáticos de glucosa
FABP4	Asociada con el aumento del riesgo de DM2
Fetulina-A	Refleja el contenido de grasa en el hígado; asociado con la inflamación inducida por lípidos e insulinoresistencia; promueve la progresión de ciertos cánceres
FGF21	Estimula la captación de glucosa en los adipocitos; aumenta la termogénesis y el gasto energético; mejora el metabolismo de glucosa y lípidos
Gremlina-1	Acción inhibitoria de BMP-4 y BMP-7
IL-1 $\beta$	Acción proinflamatoria
IL-6	Acción proinflamatoria
Leptina	Activa la señal de saciedad; regula el apetito, la ingesta de alimentos, la actividad locomotora y el gasto energético; activación del sistema inmune
Lipocalina 2	Acción proinflamatoria; marcador de riesgo de enfermedades cardiovasculares, insulinoresistencia y alteraciones renales
MCP-1	Proteína de atracción; acción inflamatoria en el tejido adiposo blanco
Nesfatina-1	Acción anorexigénica independiente de leptina
Omentina	Acción antiinflamatoria; favorece la sensibilización a la insulina
Progranulina	Proteína de atracción; acción inflamatoria en el tejido adiposo blanco; su déficit se relaciona con el desarrollo de algunas enfermedades neurodegenerativas
RBP4	Relacionada con el desarrollo de insulinoresistencia y dislipidemia
Resistina	Relacionada con el desarrollo de insulinoresistencia; acción proinflamatoria del tejido adiposo blanco
TGF $\beta$	Regula el ciclo celular: proliferación, diferenciación celular y apoptosis.
Inhibidor de metaloproteasa de matriz celular 1	Disminuye la adipogénesis; altera la tolerancia a la glucosa
TNF $\alpha$	Acción proinflamatoria
Vaspin	Inhibidor de serín proteasa; disminuye la ingesta de comida; reduce la hiperglucemia
VEGF	Estimula la angiogénesis en el tejido adiposo blanco
Visfatina	Estimula la maduración de células $\beta$ pancreáticas; activa los receptores de insulina y mejora la sensibilidad a la glucosa
Proteína 1 inducible de señalización WNT	Regula la adipogénesis y la inflamación del tejido adiposo blanco

BMP: Proteína morfogénica ósea; DM2: Diabetes mellitus tipo 2; DPP-IV: Dipeptidil-dipeptidasa IV; FABP4: Proteína transportadora de ácidos grasos 4; FGF21: Factor de crecimiento de fibroblastos 21; GIP: Polipéptido Inhibidor Gástrico; GLP-1: Péptido similar al glucagón 1; IL: Interleuquina; MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos 1; NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido; RBP4: Proteína transportadora de retinol tipo 4; TGF $\beta$ : Factor de crecimiento transformante  $\beta$ ; TNF $\alpha$ : Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$ ; VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.

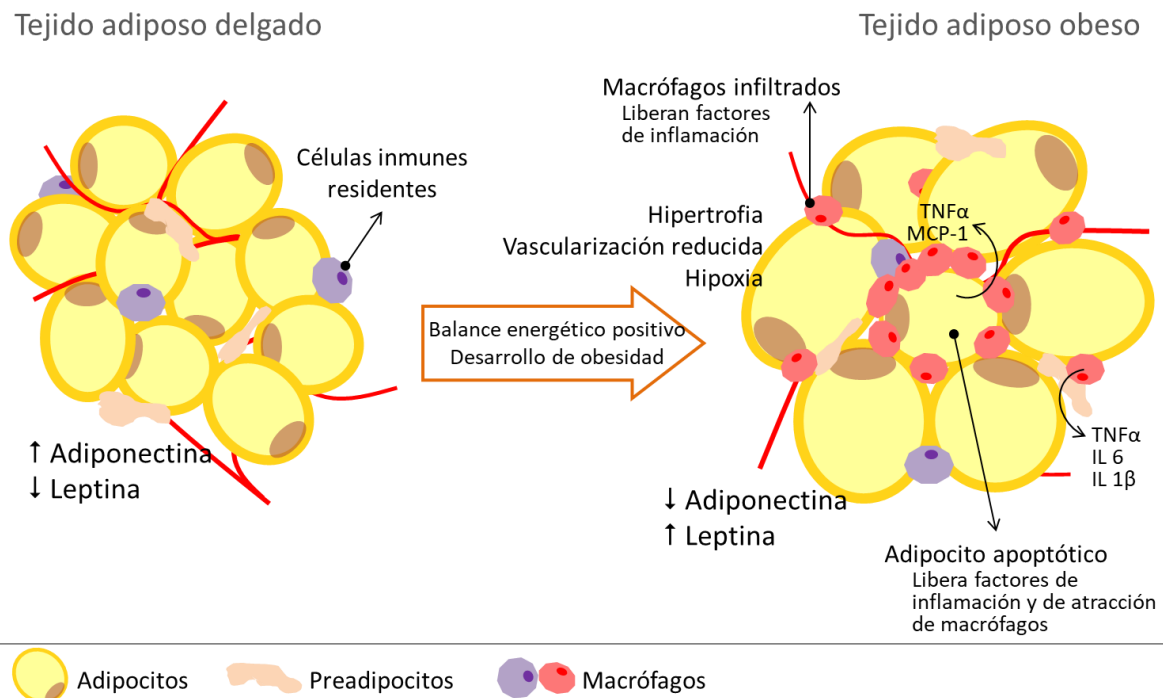


La leptina fue una de las primeras adipocitoquinas identificadas y se considera el principal factor encargado de la regulación del gasto energético y de la ingesta de alimentos. Esta adipocitoquina ejerce su función anorexigénica a nivel hipotalámico reduciendo el apetito (Fasshauer y Blüher, 2015). A medida que el tejido adiposo se expande, la secreción de leptina aumenta de forma proporcional, lo que debería reducir el apetito y la ingesta del individuo obeso. Sin embargo, se ha comprobado, que a pesar del aumento observado en los niveles plasmáticos de leptina en los pacientes con sobrepeso y/o obesidad, la ingesta de alimentos por parte de estos individuos no parece verse reducida. Este hecho se debe al desarrollo de resistencia a esta adipocitoquina a nivel sistémico, lo que provoca su acumulación en el plasma (leptinemia) (Grundy, 2015). Esta acumulación a largo plazo produce un efecto negativo en el organismo, ya que la leptina desempeña importantes funciones inmunológicas, y cuando se acumula en el plasma termina ejerciendo una actividad pro-inflamatoria exacerbada (Aguilar-Valles *et al.*, 2015).

La adiponectina se conoce como la adipocitoquina implicada en la prevención de la obesidad, debido a su función antiinflamatoria y a su capacidad para mejorar la sensibilidad a la insulina y para reducir las vías de señalización de apoptosis en el tejido adiposo. Además, la adiponectina actúa estimulando las vías de gasto energético y favorece por tanto la pérdida de peso corporal (Fasshauer y Blüher, 2015). Se ha observado recientemente que en aquellas situaciones en las que se inician las vías de señalización de apoptosis en los adipocitos, se inhibe la expresión y secreción de adiponectina, se reducen sus niveles en plasma y se agravan las alteraciones producidas en estados de obesidad (Lopes *et al.*, 2016).

La Figura 3 representa los procesos implicados en el desarrollo de inflamación en los individuos obesos. Durante los mencionados procesos de hipoxia y apoptosis, los adipocitos comienzan además a liberar adipocitoquinas proinflamatorias y de atracción de macrófagos, como la proteína quimiotáctica de macrófagos 1 (MCP-1, por sus siglas en inglés: *Monocyte Chemoattractant Protein 1*) o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ , por sus siglas en inglés: *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ). Los macrófagos reclutados inician entonces la señalización de las vías inflamatorias mediante la secreción de interleuquina 6 (IL-6), TNF- $\alpha$  e interleuquina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), entre otras

(Rühl y Landrier, 2016). Debido a que la condición de obesidad se mantiene en el tiempo, el tejido adiposo alcanza un estado de inflamación crónica leve, que suele estar presente también de forma habitual en los pacientes obesos.



**Figura 3.** Mecanismos implicados en el desarrollo de inflamación en el tejido adiposo blanco durante el desarrollo de obesidad y/o síndrome metabólico. IL: Interleuquina; MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos 1; TNF $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa.

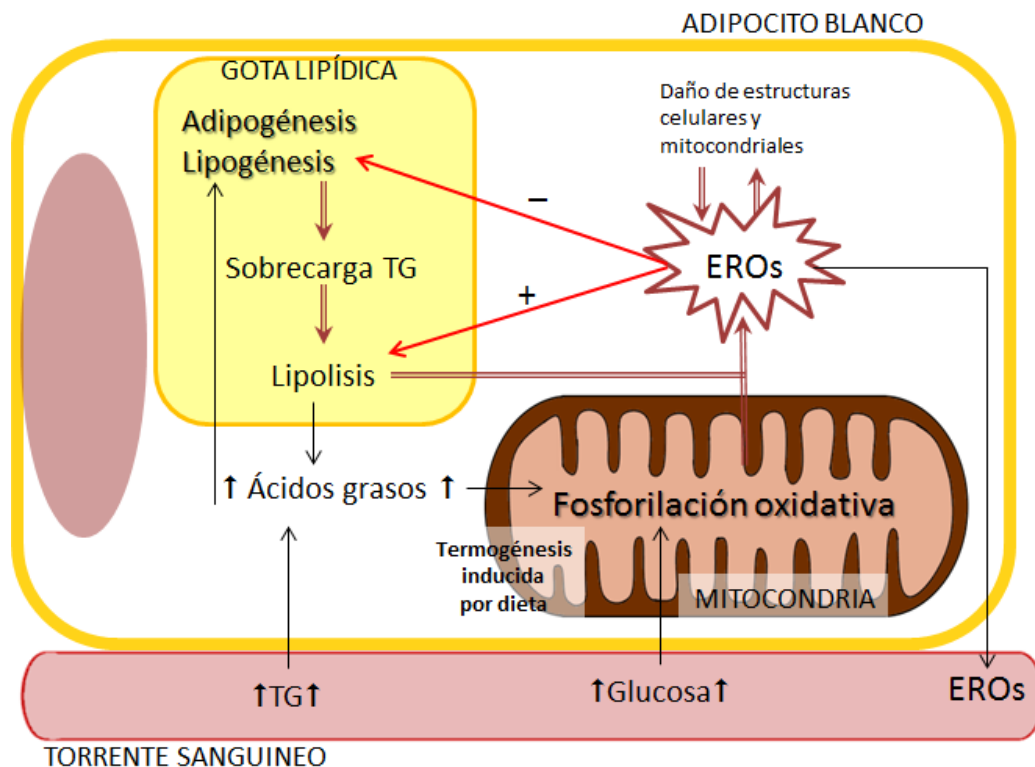
La liberación de citoquinas proinflamatorias al torrente sanguíneo afecta además a otros órganos y tejidos, y esto contribuye al desarrollo de nuevas alteraciones (Emanuela *et al.*, 2012; Nakamura *et al.*, 2014). Por ejemplo, la activación de determinadas vías inflamatorias interrumpe de forma secundaria la producción de receptores de insulina y altera la señalización producida por la insulina, lo que conlleva al desarrollo de insulinoresistencia (Lopes *et al.*, 2016).

### 1.1.1.3. Estrés oxidativo

Los procesos oxidativos son esenciales para la producción de energía en la célula. En las células animales, los principales orgánulos encargados de la producción de energía son las mitocondrias. Las mitocondrias producen energía en forma de adenosina trifosfato (ATP) mediante reacciones de fosforilación oxidativa (Wada y Nakatsuka, 2016). Durante los procesos de oxidación en la mitocondria, se liberan una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (EROs) que, gracias a los mecanismos intracelulares de defensa antioxidante, son rápidamente neutralizados manteniendo el adecuado equilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes. Cuando este equilibrio se pierde y la defensa antioxidante celular es incapaz de neutralizar las EROs producidas en las mitocondrias, se produce estrés oxidativo. Las EROs no neutralizadas son altamente reactivas y, aunque están implicadas en la regulación de múltiples procesos fisiológicamente esenciales, su producción excesiva y su acumulación en el interior celular facilita que reaccionen con las estructuras celulares, comprometiendo así la integridad de la propia célula (Castro *et al.*, 2016).

La Figura 4 representa de forma esquemática el proceso de desarrollo de estrés oxidativo en el tejido adiposo blanco en situaciones de obesidad. Actualmente se considera el desarrollo de estrés oxidativo, junto con la inflamación, como uno de los mecanismos más importantes en el desarrollo de gran parte de las alteraciones asociadas al síndrome metabólico. Además del almacenamiento de TG, el aporte continuado de energía a los adipocitos estimula la denominada “termogénesis inducida por dieta” como un mecanismo alternativo para canalizar el exceso energético que llega a la célula (García-Ruiz, 2015; Trayhurn, 2017). Cuando este mecanismo adaptativo se estimula de forma continuada, ocasiona un aumento exacerbado del metabolismo oxidativo en el tejido adiposo, que conlleva una producción excesiva de EROs que, en última instancia, dañan las estructuras mitocondriales y causan la disfunción mitocondrial (Jankovic *et al.*, 2015; Castro *et al.*, 2016; Bhatti *et al.*, 2017). El aumento de EROs en el interior celular inhibe además las vías de adipogénesis y agrava los procesos de hipertrofia e hipoxia, iniciando un ciclo vicioso en el cual el estrés oxidativo se vuelve irreversible por los propios mecanismos celulares (Trayhurn *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2016). Como consecuencia de este

proceso, las EROs se liberan al torrente sanguíneo, extendiéndose el daño oxidativo al resto del organismo.



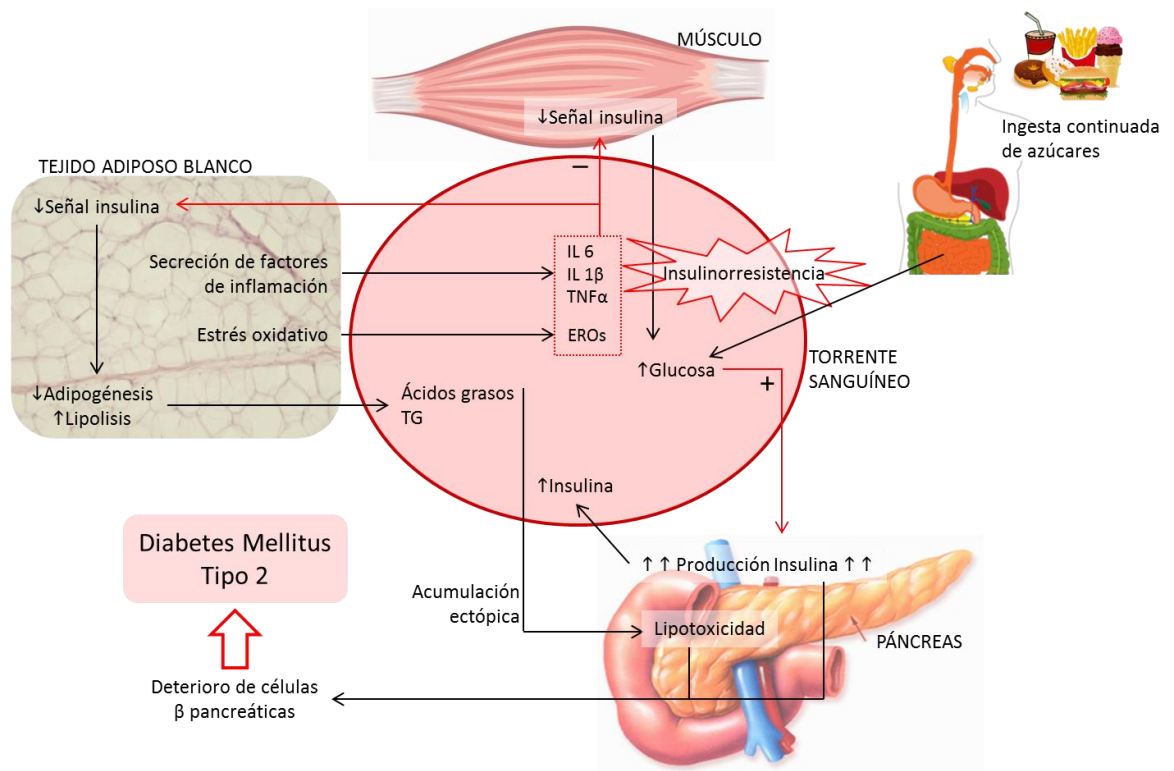
**Figura 4.** Mecanismos implicados en el desarrollo de estrés oxidativo en el tejido adiposo blanco durante el desarrollo de obesidad y/o síndrome metabólico. EROs: Especies reactivas de oxígeno; TG: Triglicéridos.

El desarrollo de estrés oxidativo está también relacionado con la disfunción de la secreción de insulina en las células  $\beta$  pancreáticas, y esto promueve el desarrollo de hiperglucemia e insulinoresistencia asociada. Asimismo, las EROs provocan la degradación del óxido nítrico producido en las células endoteliales que participa en la relajación de los vasos sanguíneos, provocando el desarrollo de disfunción endotelial e hipertensión. Las EROs también reaccionan con estructuras celulares y ácidos nucleicos, provocando mutaciones en el ADN celular y contribuyendo al desarrollo de ciertos tipos de cáncer (Marseglia *et al.*, 2015).

### 1.1.1.4. Insulinorresistencia

La insulina es una hormona secretada por las células  $\beta$  pancreáticas que tiene como función principal contrarrestar el exceso de glucosa en el torrente sanguíneo y, para ello, estimula la captación de glucosa por el resto de tejidos. Actúa además como hormona anorexigénica, e induce la secreción de determinadas moléculas implicadas en la supresión del apetito, lo que en definitiva, conduce a una reducción de la entrada de glucosa en el organismo (Pahlavani *et al.*, 2017; Trujillo *et al.*, 2018).

Durante el desarrollo del síndrome metabólico se produce resistencia a la insulina o insulinorresistencia, una alteración que se define como la incapacidad de los tejidos y órganos para responder adecuadamente a las señales mediadas por la insulina (Pahlavani *et al.*, 2017; Trujillo *et al.*, 2018). La resistencia a la insulina se produce inicialmente como consecuencia del estrés oxidativo y la inflamación presentes en el tejido adiposo blanco (Figura 5). Tanto la producción de adipocitoquinas pro-inflamatorias como la acumulación de EROs en el interior celular, interfieren en las cascadas de señalización de insulina, lo que limita la capacidad de las células para responder a esta hormona y, por tanto, su capacidad para captar la glucosa del torrente sanguíneo (Sah *et al.*, 2016). En consecuencia, los niveles de glucosa en sangre aumentan y se establece la hiperglucemia característica de los pacientes con síndrome metabólico. Ante esta situación de hiperglucemia, las células  $\beta$  pancreáticas responden con el fin de liberar una mayor cantidad de insulina al torrente sanguíneo para contrarrestar el exceso de glucosa en sangre, lo que ocasiona un aumento de los niveles de insulina en sangre o hiperinsulinemia (Trujillo *et al.*, 2018). Es importante tener en cuenta además, que los hábitos alimentarios característicos de las sociedades desarrolladas contribuyen a la instauración de la hiperglucemia como consecuencia del consumo continuado de grasas y azúcares, y esto facilita el desarrollo de resistencia a la insulina, alteración presente de forma habitual en los pacientes obesos (Sah *et al.*, 2016). Cuando esta situación de insulinorresistencia se mantiene durante largos periodos de tiempo, termina provocando un deterioro irreversible sobre las células  $\beta$  pancreáticas que, en última instancia, dejan de producir insulina y termina provocando el desarrollo de DM2.



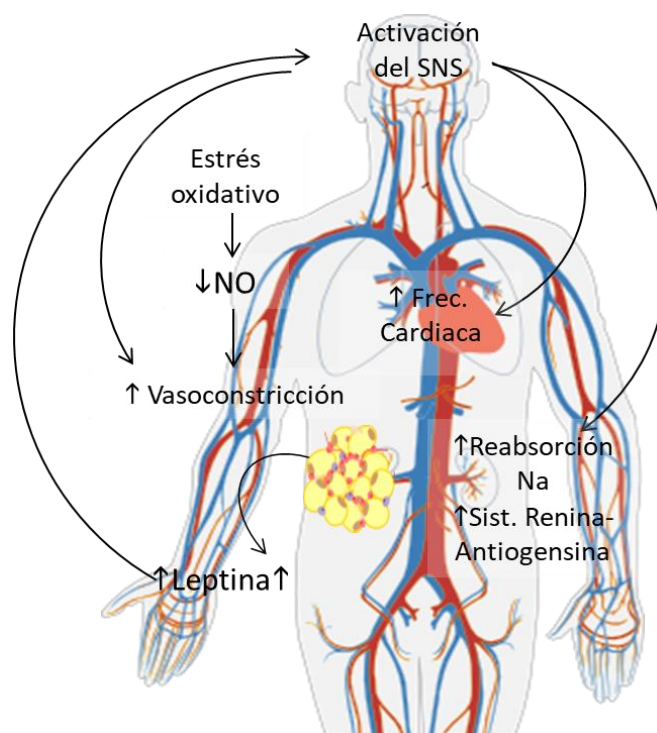
**Figura 5.** Mecanismos implicados en el desarrollo de insulinoresistencia y diabetes mellitus tipo 2 durante el desarrollo de obesidad y/o síndrome metabólico. EROs: Especies reactivas de oxígeno; IL: Interleuquina; TNFα: Factor de necrosis tumoral alfa.

Los mecanismos implicados en el desarrollo de la resistencia a la insulina mencionados en el párrafo anterior (inflamación y estrés oxidativo), contribuyen también a la acumulación de TG en el plasma sanguíneo, debido a la incapacidad de los adipocitos para incluirlos en la célula. Esto provoca la acumulación de TG en otros tejidos no grasos, como el hígado o el páncreas. Finalmente, la sobrecarga a la que se someten las células β pancreáticas y la lipotoxicidad producida por los TG acumulados en el páncreas, favorecen también el deterioro del páncreas a través de esta vía y, de la misma forma, se reduce la producción de insulina y se contribuye al establecimiento de DM2 (Sah *et al.*, 2016; Pahlavani *et al.*, 2017; Trujillo *et al.*, 2018).

### 1.1.1.5. Hipertensión

Se ha demostrado que el desarrollo de obesidad, principalmente de tipo visceral, y la secreción de adipocitoquinas como la leptina estimulan la activación del sistema nervioso simpático (Lopes *et al.*, 2016; Seravalle y Grassi, 2017; Esler *et al.*, 2018). Este sistema se encuentra implicado en la activación de varios procesos patológicos, como el aumento de la frecuencia cardíaca, el aumento de la vasoconstricción del sistema circulatorio, la estimulación de la reabsorción de sodio a nivel renal y el aumento de la actividad del sistema renina angiotensina. Todos ellos son procesos que contribuyen a aumentar la presión arterial y causan el desarrollo de hipertensión arterial a largo plazo debido al mantenimiento de la condición de obesidad en el tiempo (Seravalle y Grassi, 2017).

Por otra parte, la condición de obesidad se encuentra estrechamente relacionada con el desarrollo de estrés oxidativo (Jankovic *et al.*, 2015; Castro *et al.*, 2016; Bhatti *et al.*, 2017). Las EROs liberadas al torrente sanguíneo provocan la degradación del óxido nítrico producido por las células endoteliales, e inhiben su liberación. Esta molécula actúa como un potente vasodilatador cuando es liberada, por lo que su degradación contribuye también a incrementar los valores de presión arterial (Marseglia *et al.*, 2015; Seravalle y Grassi, 2017). El desarrollo de hipertensión, unido a la acumulación de lípidos en el torrente sanguíneo y el aumento del estrés oxidativo, provoca la formación de placas de ateroma, lo que favorece el desarrollo de enfermedades cardiovasculares que podrían poner en peligro la vida del paciente con síndrome metabólico (Cohen, 2017). En la Figura 6 se representan de forma esquemática los mecanismos implicados en el desarrollo de hipertensión en individuos con obesidad.



**Figura 6.** Mecanismos implicados en el desarrollo de hipertensión durante el desarrollo de obesidad y/o síndrome metabólico. Na: Sodio; NO: Óxido Nítrico; SNS: Sistema Nervioso Simpático.

## 1.2. Modelos experimentales para el estudio del síndrome metabólico. Obesidad inducida por dieta

A la hora de desarrollar estrategias efectivas para el tratamiento del síndrome metabólico, es inevitable llevar a cabo estudios en modelos experimentales que mimeticen de la mejor manera posible todas o la mayoría de las alteraciones desarrolladas en humanos. Sin embargo, debido a la naturaleza multifactorial del síndrome metabólico, se hace complicada la selección de un modelo animal que represente de la manera más exacta posible su fisiopatología.

Teniendo en cuenta que la obesidad abdominal se considera un factor clave para el posterior desarrollo de síndrome metabólico, es obvio que los modelos experimentales más utilizados para el estudio de esta patología hayan sido principalmente modelos animales de obesidad. En este sentido, se han utilizado modelos animales de origen genético, modelos animales en los que la obesidad se induce mediante la administración de medicamentos y modelos animales en los que se



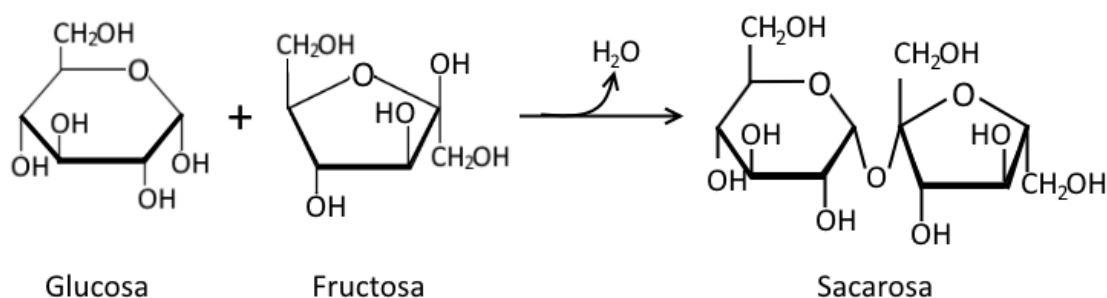
ha introducido una modificación en su dieta (Panchal y Brown, 2011; Wong *et al.*, 2016). Aunque en la actualidad existe una gran variedad de modelos animales de obesidad de origen genético que han demostrado ser útiles en la evaluación de mecanismos moleculares específicos implicados en el desarrollo de obesidad y/o síndrome metabólico, estos modelos no mimetizan de una manera fehaciente el problema que se está produciendo en la sociedad actual. El síndrome metabólico humano no se produce únicamente a causa de una alteración genética, sino que en su desarrollo intervienen factores ambientales que se concentran principalmente en la adherencia de los pacientes a un estilo de vida inadecuado, con un exceso de ingesta calórica acompañado de un estilo de vida sedentario (Panchal y Brown, 2011; Wong *et al.*, 2016). Por ello en la actualidad, los modelos animales que más se han utilizado para investigar la etiología del síndrome metabólico y sus posibles tratamientos son modelos de obesidad inducida por dieta (DIO, por sus siglas en inglés: *Diet Induced Obesity*) (Aydin *et al.*, 2014; Wong *et al.*, 2016).

Los modelos animales de DIO tienen como objetivo reproducir de una manera lo más aproximada posible lo que ocurre en los pacientes que desarrollan síndrome metabólico. Por ello, estas dietas se basan en la administración durante periodos prolongados de dietas hipercalóricas que tratan de imitar los hábitos alimentarios de la sociedad actual. En este sentido, es habitual la utilización de dietas altas en grasas, azúcares o una combinación de estos macronutrientes, siendo estas últimas dietas combinadas en las que se ha observado el desarrollo de un mayor número de alteraciones asociadas al síndrome metabólico en los modelos animales desarrollados (Panchal y Brown, 2011; Aydin *et al.*, 2014; Wong *et al.*, 2016). Este tipo de dietas, llamadas “dietas occidentales” son las que mejor mimetizan los hábitos alimentarios de la sociedad actual y consisten en un consumo elevado de alimentos procesados o refinados con alto contenido en sal, grasas y azúcares, combinado con un consumo reducido de frutas, verduras y pescado (Assifi y Eibl, 2012; Monsanto *et al.*, 2016). Hasta la fecha, se han desarrollado un amplio número de modelos animales de DIO. Estos modelos experimentales pueden clasificarse de varias formas: en función del tipo de roedor utilizado (rata o ratón habitualmente), en función de los porcentajes de grasa y/o azúcares que constituyen las dietas, y en función del tiempo durante el que

se administran las dietas (Wong *et al.*, 2016). Hay que tener en cuenta que la mayoría de los estudios realizados hasta la fecha para inducir síndrome metabólico en los modelos experimentales de DIO utilizan fructosa o sacarosa como azúcar principal (Poudyal *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2012; Dissard *et al.*, 2013; Barrios-Ramos *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014; Hao *et al.*, 2015; Machado *et al.*, 2017; Wong *et al.*, 2018).

El aumento de incidencia de obesidad en las últimas décadas ha ocurrido de forma paralela al aumento del consumo de alimentos procesados con un alto contenido en azúcares añadidos, entre los que se encuentran principalmente la sacarosa y los siropes de glucosa y fructosa. La sacarosa, comúnmente conocida como “azúcar de mesa”, es un disacárido compuesto por una molécula de fructosa y una molécula de glucosa unidos mediante enlace O-glucosídico (Figura 7). La sacarosa es el azúcar añadido más utilizado en la industria alimentaria. En los últimos años, el aumento de la demanda de compuestos endulzantes para la elaboración de alimentos procesados hizo necesario el desarrollo de compuestos que aportaran mayor poder endulzante que la sacarosa, y con ello la aparición del denominado “almidón de maíz con alto contenido en fructosa” (HFCS, por sus siglas en inglés: *High Fructose Corn Syrup*), o también conocido como Isoglucosa. Este endulzante se produce mediante una reacción de isomerización de la glucosa del almidón de maíz. En esta reacción entre el 42 y el 55% de la glucosa se isomeriza a fructosa (Hull, 2010). La crisis del mercado del azúcar de 1974 junto con la gran producción de almidón de maíz en Estados Unidos ha ocasionado que aproximadamente el 50% del consumo de sacarosa se haya sustituido por HFCS y/o fructosa en estos años. Más aún, el mayor poder endulzante de la fructosa con respecto a la sacarosa permitía añadir menor cantidad de este azúcar para conseguir el mismo nivel de dulzor, reduciendo así el gasto de producción (Grembecka, 2015). Es importante señalar además que el bajo índice glucémico que presenta la fructosa con respecto a la sacarosa o a la glucosa provocaron que durante varios años se favoreciera o priorizara el consumo de fructosa en individuos diabéticos (Evert *et al.*, 2014). Posteriormente, se observó una relación entre el consumo excesivo de fructosa y la aparición de enfermedades como HGNA, DM2 o enfermedad renal crónica (Evert *et al.*, 2014; Martins Pereira *et al.*, 2017; Yerlikaya *et al.*, 2017). Todos estos hechos llevaron a postular a la comunidad científica

que la fructosa pudiera ser la causa principal de la elevada incidencia de obesidad y síndrome metabólico en la sociedad (Martins Pereira *et al.*, 2017; Yerlikaya *et al.*, 2017).



**Figura 7.** Esquema de formación de una molécula de sacarosa a partir de la unión de una molécula de glucosa y una molécula de fructosa.

En la actualidad, son numerosos los estudios que han demostrado que la fructosa posee menos capacidad saciante que otros azúcares, y esto puede producir un aumento de la ingesta de los alimentos o productos que contienen este azúcar, de modo que se consumen más calorías (Martins Pereira *et al.*, 2017). Otro aspecto importante que hay que señalar sobre la fructosa es su carácter lipogénico (Wong *et al.*, 2016). Tras absorberse la fructosa en el intestino, el hígado recoge toda la fructosa circulante y la utiliza para producir ácidos grasos y TG, y para ello utiliza rutas metabólicas diferentes a las rutas que sigue la glucosa. Las rutas metabólicas que sigue la fructosa en el hígado inhiben las rutas glucolíticas que utilizan la glucosa como sustrato, priorizando el uso de la fructosa e inhibiendo la absorción de glucosa en el hígado y también las rutas glucogenogénicas. Además, los TG sintetizados en el hígado a partir de fructosa se liberan al torrente sanguíneo aumentando los TG circulantes y eso favorece la acumulación ectópica de TG en otros tejidos. Todos estos procesos favorecen potencialmente el desarrollo de síndrome metabólico. Este es uno de los principales motivos por el que, durante muchos años, se ha extendido el uso preferencial de fructosa respecto al uso de otros azúcares para el desarrollo de

modelos animales de DIO con el objetivo de reproducir las alteraciones asociadas con el síndrome metabólico (Aydin *et al.*, 2014; Wong *et al.*, 2016).

Sin embargo, hay que señalar que la sacarosa es el principal endulzante utilizado a nivel mundial y que este compuesto contiene cantidades equivalentes de fructosa y glucosa. Además, el HFCS es el azúcar que se utiliza preferentemente en Estados Unidos y contiene también cantidades muy similares de fructosa y glucosa, y se metaboliza de la misma manera que la sacarosa (Johnston *et al.*, 2013). Por lo tanto, se podría decir que el consumo de fructosa y glucosa es muy similar en la población de Estados Unidos. En Europa, sin embargo, la fructosa se utiliza mucho menos debido principalmente a la restricción impuesta por la Unión Europea en las cuotas de producción de isoglucosa (HFCS) (Hull, 2010). Por eso en Europa es mucho más común el uso de sacarosa o productos derivados de jarabes de glucosa, como la dextrosa (D-glucosa cristalizada), por su enorme versatilidad y también por las múltiples aplicaciones que tiene en la industria alimentaria. Por ejemplo, la dextrosa monohidratada se caracteriza por poseer un poder endulzante mucho menor que la sacarosa (Hull, 2010; Grembecka, 2015), y esto permite que la industria alimentaria pueda añadirla en múltiples alimentos procesados como potenciador de sabor, modulador del dulzor y también como conservante en alimentos salados tales como carnes procesadas o platos precocinados; se utiliza además como azúcar fermentable en la elaboración del pan y bebidas alcohólicas, así como para caramelizar algunos alimentos (Hull, 2010). Este hecho convierte a la dextrosa, o D-glucosa, en un aditivo alimentario muy versátil para la industria y con gran presencia en los hábitos de alimentación de la población europea.

Aun así, y a pesar de que la fructosa se utiliza con mucha menos frecuencia como endulzante en poblaciones europeas, la incidencia de obesidad y síndrome metabólico siguen aumentando en estas sociedades de manera alarmante (Vishram *et al.*, 2014; Suliga *et al.*, 2016; Han *et al.*, 2017; Pucci *et al.*, 2017; Raposo *et al.*, 2017). Esto nos lleva a cuestionar si la glucosa o sus derivados podrían ser también responsables en parte de la epidemia de obesidad y síndrome metabólico que se está produciendo en la sociedad actual.

### **1.3. Componentes de los alimentos con actividad biológica. El huevo como fuente de péptidos bioactivos.**

La sociedad actual es cada día más consciente de la importante relación que existe entre la dieta y la salud. Por ello, desde hace varias décadas existe una línea de investigación creciente dedicada al desarrollo y caracterización de ingredientes y alimentos funcionales que ayuden al tratamiento o a la prevención de enfermedades crónicas causadas por el envejecimiento de la población, como el síndrome metabólico. Estos alimentos se han propuesto como una posible alternativa relacionada con la modificación de los hábitos alimentarios, que consistiría en incluir en la dieta de los pacientes componentes de los alimentos con actividad biológica que aporten mejoras sustanciales a las alteraciones funcionales y/o metabólicas que se desarrollan en los pacientes obesos o con síndrome metabólico, y de este modo limitar y/o evitar la implantación de una polimedicación en estos sujetos (Miguel y Aleixandre, 2006; Andersen y Fernández, 2013; Brown *et al.*, 2015; Rochlani *et al.*, 2017). Más aún, estos componentes de origen alimentario tienen la ventaja de no causar efectos secundarios adversos, algo que sí han demostrado manifestar con frecuencia algunos fármacos (Liu *et al.*, 2010).

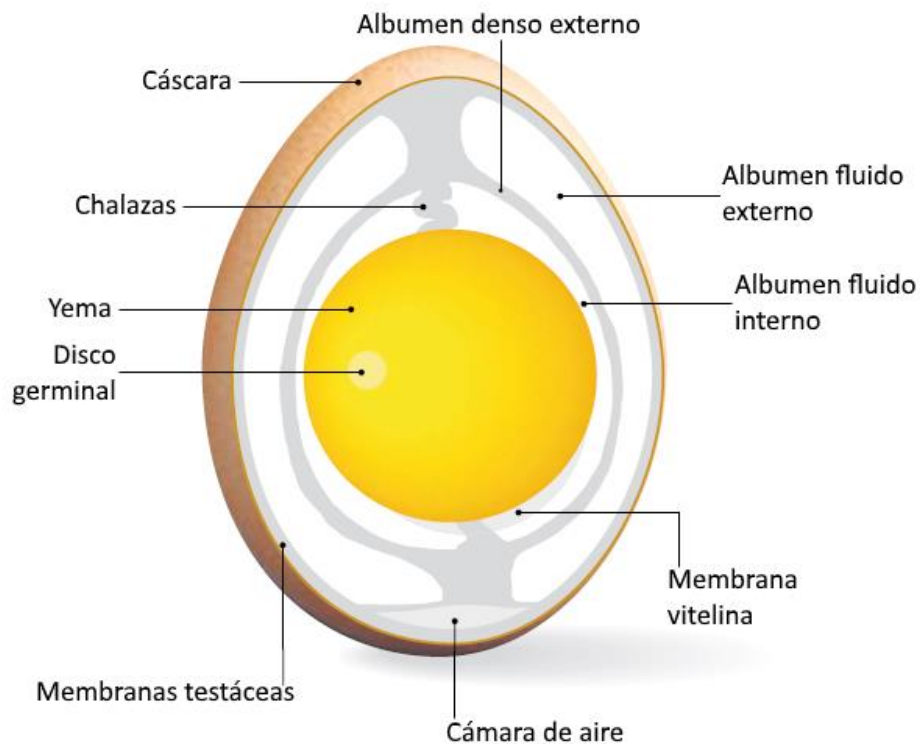
En los últimos años, estos componentes alimentarios con actividad biológica se están utilizando para desarrollar nuevos alimentos denominados alimentos funcionales. Los alimentos funcionales se definen como aquellos alimentos que, además de sus propiedades nutricionales, pueden ejercer una actividad biológica beneficiosa en el organismo tras ser ingeridos. En este sentido, hasta la fecha se han extraído y obtenido un gran número de componentes o ingredientes funcionales procedentes de alimentos tanto de origen animal como de origen vegetal, que han demostrado ejercer actividad en la mejora del síndrome metabólico o sobre alguna de sus complicaciones asociadas (Brown *et al.*, 2015). Un ejemplo de estos compuestos son los flavonoides, componentes bioactivos de los alimentos de origen vegetal. Algunos flavonoides han mostrado capacidad para reducir la grasa corporal o reducir el estado de inflamación asociado a la condición de obesidad (Galleano *et al.*, 2012). El resveratrol es un flavonoide que se extrae principalmente del vino tinto y se ha demostrado que posee actividades hipoglucémica, anti-inflamatoria, cardioprotectora,

y antitrombótica, entre otras (Brown *et al.*, 2015). Otro componente de los alimentos que ha demostrado efectos beneficiosos sobre el síndrome metabólico es la fibra dietética, cuyo consumo se ha relacionado con un menor riesgo de padecer DM2, enfermedades cardiovasculares o cáncer de colon (Kaczmarczyk *et al.*, 2012).

En los últimos años ha aumentado de forma considerable el consumo de proteínas de alto valor biológico, y se ha demostrado que el consumo de algunas de estas proteínas puede ejercer *per se* un efecto beneficioso sobre el tratamiento de las alteraciones cardiometabólicas asociadas a la obesidad o al síndrome metabólico al combinarse con la instauración de dietas hipocalóricas (Andersen y Fernández, 2013). Además, se ha demostrado que más allá de sus propiedades nutricionales, algunas proteínas alimentarias pueden ejercer también actividad biológica mediante la liberación de péptidos bioactivos durante el proceso de digestión (Majumder y Wu, 2009; Liu *et al.*, 2017). Los péptidos bioactivos se definen como moléculas inactivas en la proteína de origen que, tras su liberación mediante hidrólisis *in vitro* o *in vivo*, pueden ejercer actividad biológica (Liao *et al.*, 2018). Desde su descubrimiento en el año 1979, se han descrito péptidos bioactivos con diversas actividades biológicas como actividad antioxidante, antihipertensiva, inmunomodulante, antimicrobiana, opioide, etc. (Moughan *et al.*, 2014). Estos compuestos parecen ser eficaces como terapia alternativa en combinación con fármacos para tratar las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad, ya que algunos de estos péptidos han demostrado poder ejercer varias actividades biológicas de manera simultánea (Iwaniak *et al.*, 2018; Liao *et al.*, 2018). Estos péptidos se liberan de su proteína precursora mediante hidrólisis parcial o total, gracias a la utilización de enzimas. En este proceso la enzima utilizada, así como las condiciones de hidrólisis (pH, temperatura y tiempo) y la proteína precursora que se emplee, son factores determinantes para producir los péptidos de interés (Eckert *et al.*, 2013). Sin embargo, si bien la gran mayoría de los estudios llevados a cabo en las últimas décadas se han centrado en el aislamiento de las secuencias de péptidos concretos que se liberan tras el proceso de hidrólisis, recientemente se está constatando que la administración de hidrolizados completos podría tener mayor relevancia a nivel fisiológico que la administración de un único péptido aislado, así como un efecto biológico mucho más complejo, además de

considerarse productos más interesantes para el desarrollo de alimentos funcionales desde el punto de vista tecno-funcional y organoléptico (Liu *et al.*, 2017).

El huevo de gallina es hoy en día uno de los alimentos más consumidos por la sociedad, debido a su fácil acceso, bajo precio, elevada versatilidad en aplicaciones culinarias y también porque supone una fuente muy equilibrada de nutrientes de gran calidad y alta biodisponibilidad (Instituto de Estudios del Huevo, 2009; de Campos Zani *et al.*, 2018; Liao *et al.*, 2018). Recientemente el huevo se ha convertido en un alimento muy interesante para la obtención de péptidos bioactivos (Majumder *et al.*, 2015; Nimalaratne *et al.* 2015; Sun *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017). Desde el aislamiento e identificación del primer péptido bioactivo derivado de la clara de huevo (Fujita *et al.*, 1995), la investigación y el desarrollo de péptidos bioactivos en torno a esta fuente proteica ha experimentado un crecimiento exponencial. Es concretamente a partir del año 2010 cuando los estudios y las investigaciones sobre la producción de péptidos bioactivos derivados de huevo comienzan a ser más relevantes. En este sentido, se han obtenido hidrolizados y péptidos bioactivos procedentes de todas las estructuras del huevo que incluyen proteínas en su composición, como la clara de huevo (albumen), la yema y la membrana interna de la cáscara (membrana testácea) (Jain y Anal, 2017). En la Figura 8 se muestra el corte transversal de un huevo y se indican cada una de las partes o estructuras que lo componen.



**Figura 8.** Corte transversal del huevo y sus partes. Instituto de Estudios del Huevo, 2009.

Los hidrolizados de huevo más abundantes son los que proceden de la clara de huevo, probablemente debido a la facilidad de obtención de esta parte del huevo y debido también al elevado contenido proteico que posee (Miguel y Aleixandre 2006; Garcés-Rimón *et al.*, 2016b; Jovanović *et al.*, 2016).

En los siguientes apartados se presenta una revisión de los hidrolizados y péptidos bioactivos desarrollados a partir de las diferentes estructuras del huevo de gallina, prestando especial atención a los hidrolizados y péptidos más relevantes para el tratamiento y/o la mejora del síndrome metabólico y sus complicaciones asociadas.

### **1.3.1. Péptidos bioactivos derivados de la clara de huevo.**

La clara de huevo supone alrededor del 58% del peso total del huevo de gallina y está compuesta casi exclusivamente por agua (88-90%) y proteínas (10-12%) (Tabla 4). La riqueza y el equilibrio en aminoácidos esenciales de la proteína de la clara de



huevo (Tabla 5) hace que sea considerada de muy alto valor biológico y se usa como proteína de referencia para valorar la calidad de otras proteínas alimentarias (Instituto de estudios del huevo, 2009; Yu *et al.*, 2011b; Garcés-Rimón *et al.*, 2016b; Liao *et al.*, 2018). Además, gracias a su alta capacidad saciante supone una fuente proteica de gran interés en la elaboración de dietas hipocalóricas para pacientes con sobrepeso (Du *et al.*, 2017).

**Tabla 4.** Composición nutricional de la clara de huevo fresca. Extraído y traducido de la base de datos nacional del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA Food Composition Databases, 2018).

Composición nutricional por 100 g:	
Agua (g)	87.57
Proteínas (g)	10.90
Lípidos (g)	0.17
Carbohidratos (g)	0.73
Minerales (mg)	362.11
Vitaminas (mg)	0.56
Energía (kcal)	52

**Tabla 5.** Proteínas mayoritarias y composición de aminoácidos de la fracción proteica de la clara de huevo fresca. Extraído y traducido de la base de datos nacional del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA Food Composition Databases, 2018) y Li-Chan y Kim (2008).

Proteínas mayoritarias (% sobre la fracción proteica):			
Ovoalbúmina		54	
Ovotransferrina		13	
Ovomucoide		11	
Ovomucina		3.5	
Lisozima		3.4	
Contenido de aminoácidos (%)			
Triptófano	0.999	Valina	5.164
Treonina	3.685	Arginina	4.412
Isoleucina	4.581	Histidina	1.830
Leucina	6.838	Alanina	4.684
Lisina	5.515	Ácido aspartico	8.253
Metionina	2.790	Ácido glutámico	10.770
Cisteína	2.102	Glicina	2.842
Fenilalanina	4.736	Prolina	3.153
Tirosina	3.153	Serina	5.593

En la Tabla 6 se resumen los diferentes hidrolizados bioactivos obtenidos a partir de la clara de huevo.

Algunos estudios utilizan para la obtención de péptidos bioactivos proteínas aisladas de la clara de huevo, como ovoalbúmina (Fujita *et al.*, 1995; Matoba *et al.*, 1999), lisozima (Carrillo *et al.*, 2016; Plat *et al.*, 2017) u ovotransferrina (Huang *et al.*, 2010a; Shen *et al.*, 2010). Sin embargo, lo más habitual es que el proceso de hidrólisis se realice a partir de la clara completa (You y Wu, 2011; Nimalaratne *et al.*, 2015; Garcés-Rimón *et al.*, 2016b).

En 1995, Fujita *et al.* obtuvieron y aislaron el primer péptido bioactivo derivado de la clara de huevo, procedente de la ovoalbúmina, que presentaba actividad vasodilatadora y actividad antihipertensiva. Denominaron a este péptido “ovoquinina” por su similitud estructural y porque ejercería una actividad biológica similar a la ejercida por el péptido fisiológico bradiquinina (Fujita *et al.*, 1995; Matoba *et al.*, 1999). Desde entonces y hasta la fecha, se ha demostrado el gran potencial de las proteínas de la clara de huevo como fuente de hidrolizados y péptidos bioactivos con funciones muy diversas, siendo las actividades inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) y antihipertensiva las más investigadas (de Campos Zani *et al.*, 2018).

Un hidrolizado de clara de huevo tratado con alcalasa durante 3 horas mostró *in vitro* una actividad IECA de hasta el 58% (Liu *et al.*, 2010). Posteriormente, estos autores consiguieron aislar e identificar diferentes péptidos de ese hidrolizado. El péptido RVPSL, derivado de la proteína ovotransferrina demostró poseer una potente actividad antioxidante y anticoagulante *in vitro*, además de actividad IECA (Yu *et al.*, 2011a). El fragmento RVPSLM, también derivado de la proteína ovotransferrina, mostró capacidad de inhibir la enzima  $\alpha$ -glucosidasa y, por tanto, podría utilizarse como potencial péptido antidiabético (Yu *et al.*, 2011b). En estudios posteriores realizados por el mismo grupo de investigación, se evaluó la actividad IECA de otros péptidos aislados del mismo hidrolizado de clara de huevo con alcalasa (Yu *et al.*, 2011c; Yu *et al.*, 2012). Sin embargo, son escasos los estudios *in vivo* llevados a cabo con este hidrolizado o con sus péptidos derivados (Yu *et al.*, 2016).

**Tabla 6.** Resumen de hidrolizados bioactivos obtenidos a partir de la clara de huevo. DPP-IV: Dipeptidil Peptidasa IV; IECA: Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina.

Proteína sustrato	Enzima usada	Tiempo de hidrólisis	Péptidos identificados	Actividad biológica		Referencias
Clara de huevo	Alcalasa	3h	RVPSL	IECA	<i>In vitro</i>	Liu <i>et al.</i> , 2010
			x	Antioxidante, IECA	<i>In vitro</i>	You y Wu, 2011
			RVPSL	Antioxidante, IECA, anticoagulante	<i>In vitro</i>	Yu <i>et al.</i> , 2011a
			RVPSLM	Antidiabético	<i>In vitro</i>	Yu <i>et al.</i> , 2011b
			QIGLF	IECA	<i>In vitro</i>	Yu <i>et al.</i> , 2011c
			RVPSL, QIGLF, TNGIIR	IECA	<i>In vitro</i>	Yu <i>et al.</i> , 2012
			TNGIIR, RVPSL	IECA, ansiolítico	<i>In vivo</i>	Yu <i>et al.</i> , 2016
		No especificado	x	Antioxidante	<i>In vitro</i>	Jovanović <i>et al.</i> , 2016
	Pepsina	3h	YAEERYPIL, SALAM, YQIGL, YRGGLEPINF, YPI	Antioxidante	<i>In vitro</i>	Dávalos <i>et al.</i> , 2004
			RADHPFL, FRADHPFL, YAEERYPIL	IECA	<i>In vitro</i>	Miguel <i>et al.</i> , 2004
			x	Antihipertensivo	<i>In vivo</i>	Miguel <i>et al.</i> , 2005
			x	Antihipertensivo	<i>In vivo</i>	Miguel <i>et al.</i> , 2006
			x	Antihipertensivo	<i>In vivo</i>	Miguel <i>et al.</i> , 2007b
			x	Antioxidante, hipolipemiante	<i>In vivo</i>	Manso <i>et al.</i> , 2008
		8h	FRADHPFL, RADHPFL, YAEERYPIL, YRGGLEPINF, ESIINF, RDILNQ, IVF, YQIGL, SALAM, FSL	Antioxidante, IECA, Anti-inflamatorio, hipocolesterolémico, inhibición DPP-IV	<i>In vitro</i>	Garcés-Rimón <i>et al.</i> , 2016b
			x	Antioxidante, Anti-inflamatorio, Hipolipemiante	<i>In vivo</i>	Garcés-Rimón <i>et al.</i> , 2016a
			x	Antioxidante, quelante	<i>In vivo</i>	Rizzetti <i>et al.</i> , 2016a; Rizzetti <i>et al.</i> , 2016b
			x	Modulación de microbiota	<i>In vivo</i>	Requena <i>et al.</i> , 2017
			x	Antioxidante, IECA, antihipertensivo	<i>In vivo</i>	Rizzetti <i>et al.</i> , 2017a
			x	Antioxidante, Anti-inflamatorio	<i>In vivo</i>	Rizzetti <i>et al.</i> , 2017b

**Tabla 6 (cont.).** Resumen de hidrolizados bioactivos obtenidos a partir de la clara de huevo. DPP-IV: Dipeptidil Peptidasa IV; IECA: Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina.

Proteína sustrato	Enzima usada	Tiempo de hidrólisis	Péptidos identificados	Actividad biológica		Referencias
Clara de huevo	Papaína	3h	x	Antioxidante, IECA	<i>In vitro</i>	Chen y Chi, 2012
	Termolisina	3h	x	Antioxidante, IECA	<i>In vitro</i>	You y Wu, 2011
	Proteasa P	3h	EERYP, AEERYP, DEDTQAMP, PVDENDEG	Antioxidante	<i>In vitro</i>	Nimalaratne <i>et al.</i> , 2015
	Aminopeptidasa	24h	x	Anti-inflamatorio, Inmunomodulante	<i>In vivo</i>	Lee <i>et al.</i> , 2009
	Neutrasa	4h	x	IECA, Antihipertensivo	<i>In vitro, In vivo</i>	Kim <i>et al.</i> , 2003
	Peptidasa 433P	24h	LPDEVSG, DDNKVED, GVDTKSD, IESGSVEQA, GLVYT	Antioxidante, IECA, Anti-inflamatorio, hipocolesterolémico, inhibición DPP-IV	<i>In vitro</i>	Garcés-Rimón <i>et al.</i> , 2016b
	Pepsina + Pancreatina	3h + 3h	x	Antioxidante, IECA	<i>In vitro</i>	You y Wu, 2011
	Termoasa + Pepsina	90' + 3h	x	Antihipertensivo	<i>In vivo, Ex vivo</i>	Jahandideh <i>et al.</i> , 2016
Ovoalbúmina			x	Anti-diabética, Estimula la diferenciación del tejido adiposo	<i>In vitro</i>	Jahandideh <i>et al.</i> , 2017
	Pepsina	3h	FRADHPFL FGRCVWP, ERKIKVYL, FFGRCVSP, LW, FCF, NIFYCP	Vasodilatador IECA	<i>Ex vivo</i> <i>In vitro, In vivo</i>	Fujita <i>et al.</i> , 1995 Fujita <i>et al.</i> , 2000
	Quimiotripsina	12h + 12h	RADHPF	Vasodilatador	<i>Ex vivo</i>	Matoba <i>et al.</i> , 1999

**Tabla 6 (cont.).** Resumen de hidrolizados bioactivos obtenidos a partir de la clara de huevo. DPP-IV: Dipeptidil Peptidasa IV; IECA: Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina.

Proteína sustrato	Enzima usada	Tiempo de hidrólisis	Péptidos identificados	Actividad biológica		Referencias
Lisozima	Pepsina	6h	VAWRNRCKGTD, WRNRCKGTD, AWIRGCRL, WIRGCRL	Antioxidante	<i>In vitro</i>	Carrillo <i>et al.</i> , 2016
	Alcalasa	3h	x	Antioxidante, antihipertensivo	<i>In vitro</i>	You <i>et al.</i> , 2010
		No especificado	x	Antihipertensivo	<i>In vivo</i> . Ensayo clínico	Plat <i>et al.</i> , 2017
	Pepsina + Quimiotripsina:Tripsina	5h + 2h	VAW, MKR	IECA	<i>In vitro</i>	Rao <i>et al.</i> , 2012a
		2h + 4h	KVF, MKR, AMK, AKF, RGY, WIR, VAW	Antioxidante, IECA	<i>In vitro</i>	Rao <i>et al.</i> , 2012b
Ovotransferrina	Termolisina	3h	WNIP	Antioxidante	<i>In vitro</i>	Shen <i>et al.</i> , 2010
	Termolisina + Pepsina	3h + 3h	IRW, LKP	Antioxidante	<i>In vitro</i>	Huang <i>et al.</i> , 2010a
			x	Antioxidante	<i>In vitro</i>	Huang <i>et al.</i> , 2012
Ovomucina	Alcalasa	4h	x	Anti-inflamatorio	<i>In vitro</i>	Sun <i>et al.</i> , 2016

Se ha comprobado que muchas enzimas presentan dificultades para acceder e hidrolizar la proteína sustrato debido a su estructura terciaria. En base a esto, algunos investigadores han diseñado sus estudios con el fin de conseguir el máximo grado de hidrólisis posible y así obtener una mayor liberación de péptidos. Por ejemplo, Manso *et al.* (2008), estudiaron el efecto de aplicar altas presiones hidrostáticas al proceso de hidrólisis que sufría la ovoalbúmina con diferentes enzimas. Este estudio demostró que las altas presiones provocaban la formación de dímeros en la ovoalbúmina, haciéndola más accesible a las enzimas pepsina, quimiotripsina y tripsina, facilitando el proceso de hidrólisis y acortando así los tiempos de incubación (Manso *et al.*, 2008). Otros autores han optado por el uso de varias enzimas y diferentes tiempos de incubación para aumentar el grado de hidrólisis de la proteína sustrato y facilitar la liberación de secuencias bioactivas (You y Wu, 2011; Rao *et al.*, 2012a; Rao *et al.*, 2012b). Jahandideh *et al.* desarrollaron un hidrolizado de clara de huevo en el que se realizaban dos periodos de hidrólisis secuenciales: en una primera fase se utilizaba la enzima termoasa durante 90 minutos y posteriormente, el producto se trataba con pepsina durante 3 horas (Jahandideh *et al.*, 2016). El hidrolizado resultante de este proceso fue capaz de mejorar la relajación vascular y fue capaz de disminuir la presión arterial en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) (Jahandideh *et al.*, 2016). Más recientemente, se ha descrito que este hidrolizado también fue capaz de estimular *in vitro* la diferenciación del tejido adiposo, lo que sugiere la posibilidad de que este hidrolizado pueda ejercer también una actividad antidiabética (Jahandideh *et al.*, 2017).

Nuestro grupo de investigación obtuvo un hidrolizado de clara de huevo con pepsina durante 3 horas con actividad IECA y actividad antioxidante *in vitro*. De este hidrolizado se aislaron e identificaron varios péptidos que presentaron actividad IECA (Miguel *et al.*, 2004) y/o una potente actividad antioxidante (Dávalos *et al.*, 2004). Es importante señalar que varios factores pueden condicionar la potencial actividad biológica de los péptidos cuando se administran por vía oral. Entre estos factores destacan los factores fisiológicos, incluyendo la resistencia a las enzimas gastrointestinales y al pH, y la biodisponibilidad (absorción, transporte y capacidad para alcanzar sus lugares de acción) (Liao *et al.*, 2018; Santos-Hernández *et al.*, 2018).

Por ello, nuestro grupo realizó estudios de simulación de la digestión gastrointestinal con el hidrolizado de clara de huevo desarrollado. En este estudio se comprobó, que los péptidos antihipertensivos YAEERYPIL y RADHPFL, se hidrolizaron durante el proceso de simulación de la digestión *in vitro*. Estos resultados nos llevaron a postular que los productos de hidrólisis derivados de estas secuencias podrían ser los responsables directos del efecto antihipertensivo. Se observó además que alguna de las secuencias liberadas tras la simulación de la digestión no tenían actividad IECA, aunque estudios posteriores demostraron que este hidrolizado y algunos de sus péptidos derivados ejercían actividad vasodilatadora *ex vivo* (Miguel *et al.*, 2007a), por lo que se sugirió que podría existir otro mecanismo de acción implicado en la actividad antihipertensiva de estos compuestos.

Como se ha mencionado anteriormente la resistencia a las enzimas del tracto digestivo es un prerequisite para que los péptidos que se administran por vía oral muestren un efecto biológico, pero también podría ocurrir que fragmentos que presentan poca actividad *in vitro* sean capaces de adquirir esta actividad *in vivo*, gracias a la actuación sobre ellos de las enzimas digestivas. En cualquier caso será necesario que cuando estas secuencias se administren *in vivo* sean capaces de alcanzar su lugar de actuación en forma activa, una vez que han actuado las enzimas digestivas y/o plasmáticas (Liao *et al.*, 2018; Santos-Hernández *et al.*, 2018). Por este motivo es imprescindible llevar a cabo estudios que evalúen el comportamiento de los hidrolizados y sus péptidos tras el proceso de digestión, y es necesario además probar los diferentes productos potencialmente bioactivos en diferentes modelos experimentales con el objetivo de evaluar *in vivo* la eficacia de los mismos. En posteriores estudios, Miguel *et al.* comprobaron la eficacia antihipertensiva del hidrolizado de clara de huevo tratado durante 3 horas con pepsina en ratas SHR tras su administración aguda y crónica por vía oral (Miguel *et al.*, 2005; Miguel *et al.*, 2006; Miguel *et al.*, 2007b). Estos estudios en animales hipertensos permitieron relacionar el efecto antihipertensivo con la inhibición de la ECA *in vivo* (Miguel *et al.*, 2007b), con una reducción del estrés oxidativo y con una reducción en los niveles plasmáticos de colesterol y TG (Manso *et al.*, 2008).

Dado el interés que existe en la actualidad por obtener alimentos funcionales con multiactividad para el tratamiento del síndrome metabólico y el potencial que presenta la clara de huevo como fuente de péptidos bioactivos, Garcés-Rimón *et al.* (2016b) llevaron a cabo un estudio *in vitro* en el que trataron de obtener hidrolizados derivados de clara de huevo que mostraran potencial para controlar diferentes complicaciones asociadas al síndrome metabólico de forma simultánea. En este estudio se obtuvieron dos hidrolizados con potencial actividad en el tratamiento de esta patología: un primer hidrolizado de clara de huevo con pepsina durante 8 horas que mostró ejercer actividades antioxidante e IECA *in vitro*, y un segundo hidrolizado de clara de huevo con peptidasa 433P durante 24 horas que mostró ejercer actividad antioxidante e hipocolesterolémica *in vitro*. Además, el hidrolizado de clara de huevo con pepsina durante 8 horas liberó secuencias peptídicas previamente descritas por sus actividades antioxidante e IECA (Miguel *et al.*, 2004; Dávalos *et al.*, 2004). Posteriormente, se demostró que el hidrolizado de clara de huevo con pepsina durante 8 horas era el más prometedor, ya que mostró ser capaz de reducir el estrés oxidativo y la inflamación producida en ratas Zucker obesas, y redujo también la esteatosis hepática característica de este modelo animal (Garcés-Rimón *et al.*, 2016a). Este hidrolizado también mostró actividad moduladora de la microbiota intestinal, mediante la reversión de la disbiosis producida en el intestino de las ratas Zucker obesas (Requena *et al.*, 2017). En estudios recientes Rizzetti *et al.*, comprobaron que la coadministración de este mismo hidrolizado a ratas Wistar expuestas a mercurio durante 60 días, era capaz de revertir las alteraciones cardiovasculares y neurológicas asociadas con un aumento del estrés oxidativo ocasionado por la exposición a este metal (Rizzetti *et al.*, 2016b; Rizzetti *et al.*, 2017a; Rizzetti *et al.*, 2017b). Inicialmente, los investigadores propusieron que las actividades previamente descritas en este hidrolizado (IECA, vasodilatadora y antioxidante) podrían ser de utilidad para revertir las alteraciones producidas en este modelo de toxicidad a mercurio. Sin embargo, recientemente se ha postulado que el hidrolizado de clara de huevo con pepsina durante 8 horas puede estar ejerciendo una actividad quelante del metal relacionada con su mecanismo de acción antioxidante, que evitaría el depósito de mercurio en el organismo (Rizzetti *et al.*, 2016a).



### 1.3.2. Péptidos bioactivos derivados de la yema de huevo

La yema constituye la parte central del huevo, y se encuentra completamente separada de la clara. Esta estructura contiene las principales vitaminas, lípidos y minerales del huevo, y se considera su estructura nutricionalmente más valiosa (Instituto de estudios del huevo, 2009). La yema está compuesta principalmente por agua (50%), grasas (26%) y proteínas (16%) (Tabla 7). El alto contenido en fosfolípidos, especialmente lecitinas, convierten a la yema en un producto de gran interés para la industria alimentaria y farmacéutica, ya que posee numerosas aplicaciones como surfactante, lubricante y agente emulsionante (Yousr y Howell, 2015).

**Tabla 7.** Composición nutricional de la yema de huevo fresca y composición de proteínas de la fracción proteica de la yema de huevo. Extraído y traducido de la base de datos nacional del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA Food Composition Databases, 2018) y Li-Chan y Kim (2008).

Composición nutricional por 100 g:	
Agua (g)	52.31
Proteínas (g)	15.86
Lípidos (g)	26.54
Carbohidratos (g)	3.59
Minerales (mg)	686.03
Vitaminas (mg)	5.06
Energía (kcal)	322
Composición proteica (% sobre la fracción proteica):	
Lipovitulina	40.0
Apovitulina I-VI	37.3
Fosvitina	13.3
Livetina	9.4

La investigación sobre la producción de péptidos bioactivos a partir de las proteínas de la yema de huevo surgió como una necesidad de aprovechar el residuo proteico resultante del proceso de desgrasado de la yema. Las investigaciones en torno a este subproducto son aún escasas debido a que el proceso de desgrasado provoca también la desnaturalización de sus proteínas, lo que dificulta su hidrólisis (Wang y Wang, 2009). Más allá de su actividad biológica, otros estudios se han centrado en mejorar las propiedades tecnofuncionales de la yema de huevo con el

objetivo de encontrar nuevas aplicaciones industriales (Wang y Wang, 2009; Bao *et al.*, 2017).

Algunas proteínas de la yema de huevo, como la fosvitina, se caracterizan por su elevada actividad antioxidante y quelante de metales (Chay Pak Ting *et al.*, 2011). Por este motivo, algunos de los hidrolizados obtenidos de este subproducto proteico tratan de obtener péptidos con estas actividades biológicas. Por ejemplo, el subproducto proteico de yema hidrolizado con alcalasa durante 18 horas demostró ejercer actividad antioxidante *in vitro* (Park *et al.*, 2001). En otro estudio realizado por Young *et al.* (2010), se realizó el proceso de hidrólisis de este subproducto en dos etapas secuenciales: en una primera etapa de hidrólisis se utilizó alcalasa durante 3 horas y posteriormente, se incubó con una mezcla de proteasas durante un mínimo de 15 horas. Este hidrolizado mostró actividad antioxidante *in vitro*, y también demostró actividad antioxidante *in vivo* en un modelo de estrés oxidativo inducido en el intestino de cerdos lactantes.

Varios hidrolizados obtenidos a partir de los subproductos proteicos de yema de huevo han demostrado ejercer actividades multifuncionales muy interesantes para el tratamiento de la obesidad o el síndrome metabólico y sus complicaciones asociadas. Eckert *et al.* (2014) obtuvieron un hidrolizado de yema utilizando una proteasa de origen vegetal (extraída de *Cucurbita ficifolia*) durante 4 horas que mostró actividad IECA *in vitro*. De este hidrolizado se aislaron e identificaron dos péptidos que mostraron una actividad IECA mucho mayor: LAPSLPGKPKPD ( $IC_{50}=1.97 \mu\text{mol/L}$ ) y ITMIAPSAF ( $IC_{50}=3.24 \mu\text{mol/L}$ ). Asimismo, en estudios posteriores realizados por ese mismo grupo de investigación, este hidrolizado y el péptido LAPSLPGKPKPD demostraron potencial actividad antidiabética y antioxidante *in vitro* (Zambrowicz *et al.*, 2015a). Ese mismo año, Zambrowicz *et al.*, (2015b) obtuvieron un hidrolizado de la fracción proteica de la yema de huevo con pepsina durante 2 horas que también mostró multiactividad biológica *in vitro*. En este estudio se evaluaron la actividad IECA y la actividad antidiabética del hidrolizado mediante la determinación de su capacidad para inhibir a las enzimas  $\alpha$ -glucosidasa y dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV). Asimismo, se evaluó su capacidad antioxidante y quelante de metales. De los 4 péptidos aislados e identificados en este estudio, uno de ellos mostró una prometedora multiactividad

biológica. La secuencia YINQMPQKSRE demostró actividad IECA ( $IC_{50}=10.1 \mu\text{g/mL}$ ), actividad inhibidora de DPP-IV ( $IC_{50}=222.8 \mu\text{g/mL}$ ), actividad antioxidante ( $2.3 \mu\text{M Trolox}_{\text{eq}}/\text{mg}$  evaluado mediante DPPH) y actividad quelante del ion hierro ( $37.0 \mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mg}$ ) (Zambrowicz *et al.*, 2015b). Sin embargo, hasta la fecha no se ha evaluado ningún estudio en modelos experimentales para demostrar la eficacia de estos hidrolizados *in vivo*.

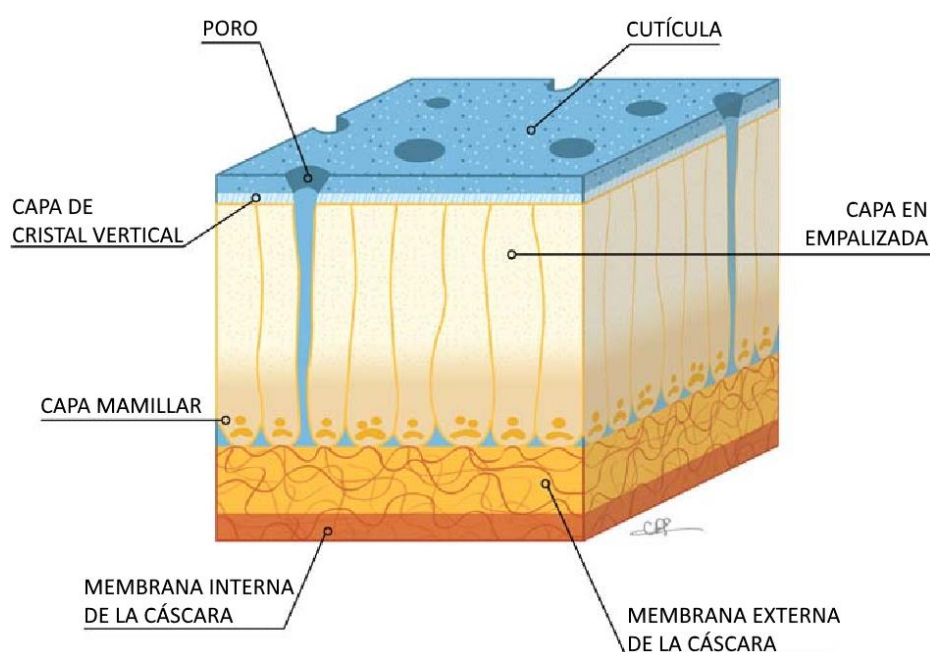
De todos los estudios publicados hasta el momento, no se ha publicado ningún estudio en que se produzca hidrólisis a partir de la yema de huevo completa, para producir péptidos bioactivos o para obtener productos con propiedades tecnofuncionales novedosas. Además, cabe destacar que muy pocos estudios han evaluado la eficacia de los hidrolizados utilizando modelos experimentales *in vivo* (Young *et al.*, 2010), y no existen estudios de intervención en humanos con hidrolizados de yema de huevo.

### 1.3.3. Péptidos bioactivos derivados de la membrana de la cáscara de huevo

La cáscara de huevo está principalmente compuesta por materia inorgánica, principalmente por carbonato de calcio (Tabla 8). En la cáscara de huevo se diferencian cuatro capas o estructuras, que tienen como función proporcionar resistencia física y evitar la entrada de patógenos al interior del huevo. Estas estructuras se denominan cutícula, capa empalizada o esponjosa, capa mamilar y la capa más interna denominada membrana de la cáscara (Figura 9) (Hincke *et al.*, 2012). En el momento actual se estima que se desechan unos 8 millones de toneladas de cáscara de huevo cada año a nivel mundial (De Angelis *et al.*, 2017). La cáscara de huevo constituye por ello, un subproducto muy importante derivado de la industria del huevo que se utiliza principalmente en agricultura para enriquecer los suelos agrícolas y para la elaboración de piensos animales (De Angelis *et al.*, 2017). Sin embargo, debido a la elevada producción de huevos y ovoproductos de los últimos años, se demanda encontrar una aplicación alternativa para este subproducto.

**Tabla 8.** Composición de la cáscara de huevo completa. Extraído y traducido de Li-Chan y Kim (2008) y Hincke *et al.* (2012).

Composición (%):	
Materia inorgánica	95.0
Materia orgánica	3.5
Proteínas	2.0
Lípidos y azúcares	1.5
Agua	1.5



**Figura 9.** Detalle de las membranas componentes de la cáscara de huevo. Tomado y traducido de Hincke *et al.*, 2012.

La membrana que se encuentra adherida a la cara interna de la cáscara se caracteriza por su alto contenido en proteínas, especialmente colágeno (Huang *et al.*, 2010b). Aunque tradicionalmente se ha desechado esta estructura junto con la cáscara, se han desarrollado métodos para extraer esta membrana (Baláž, 2014) que han permitido el desarrollo de numerosas aplicaciones gracias a sus propiedades químicas y mecánicas, así como a su bajo coste (Park *et al.*, 2016). En ingeniería medioambiental se ha estudiado la utilización de sorbentes basados en la membrana de la cáscara de huevo para la extracción de ciertas moléculas orgánicas e iones

metálicos no deseados en los sustratos (Park *et al.*, 2016). En biomedicina se ha investigado el uso de este material como película biocompatible y biodegradable para el tratamiento de heridas y quemaduras gracias a su alto contenido en colágeno (Jensen *et al.*, 2015; Santana *et al.*, 2016).

Hasta el momento, la limitada solubilidad de la membrana interna de la cáscara de huevo dificulta su utilización para la producción de péptidos bioactivos (Huang *et al.*, 2010b). Sin embargo, a pesar de este inconveniente, la literatura actual recoge algunos estudios en que se producen hidrolizados y péptidos bioactivos a partir de la membrana de la cáscara de huevo. El método de hidrólisis puede variar en este caso, ya que en algunos estudios esta membrana se somete a un proceso de solubilización previo mediante el uso de solventes (Santana *et al.*, 2016), mientras que en otros estudios la membrana se somete a la hidrólisis sin recurrir a ningún tratamiento previo (Shi *et al.*, 2014; Jain y Anal, 2017). La actividad antioxidante es una de las más investigadas en la producción de hidrolizados derivados de la membrana de la cáscara de huevo. Esto se debe a que el colágeno ha demostrado ser una fuente potencial de péptidos antioxidantes (Mendis *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2010b). Además de las propiedades antioxidantes, varios hidrolizados derivados de esta estructura han mostrado poseer varias actividades biológicas de forma simultánea. Por ejemplo, Santana *et al.* (2016), demostraron que tras solubilizar la membrana de la cáscara con ácido acético y someterla a una hidrólisis utilizando una mezcla de tres enzimas diferentes, se obtenía un hidrolizado con actividades IECA y antioxidante *in vitro*. En otro estudio realizado por Jain y Anal (2017), los investigadores recurrieron a la utilización de procesos fermentativos en la membrana, y se obtuvo así un hidrolizado proteico que presentaba simultáneamente actividades antioxidante, IECA y antimicrobiana *in vitro*. Este hidrolizado poseía además propiedades tecnofuncionales mejoradas, muy interesantes para su aplicación industrial (Jain y Anal, 2017).

La composición característica de la membrana interna de la cáscara, rica en colágeno, condroitina y ácido hialurónico, convierte a esta estructura del huevo en un candidato ideal para la obtención de hidrolizados y péptidos que ayuden en el tratamiento y prevención de enfermedades articulares, o que se utilicen como tratamiento alternativo para facilitar la recuperación articular producida tras la

realización de ejercicio físico (Ruff *et al.*, 2009; Jensen *et al.*, 2015). Cabe destacar que, aunque ya hemos comentado que los estudios de intervención en humanos en torno al estudio de péptidos bioactivos derivados del huevo son escasos, algunos de estos estudios se han llevado a cabo con hidrolizados derivados de la membrana de la cáscara con el objetivo de evaluar su eficacia y seguridad en pacientes con alteraciones articulares (Ruff *et al.*, 2009; Jensen *et al.*, 2015).

#### **1.3.4. Marco legislativo para el desarrollo de alimentos funcionales. Los péptidos bioactivos como alimento funcional**

En el momento actual, existen en el mercado una gran cantidad de alimentos funcionales que alegan ejercer efectos beneficiosos para la salud más allá de sus propiedades nutricionales. En Europa, estas alegaciones de salud se encuentran reguladas por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés: *European Food Safety Authority*), bajo las pautas establecidas en el Reglamento (CE) Nº1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de Diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y propiedades saludables de los alimentos. La llegada de este reglamento marcó un punto de inflexión en el mercado de los alimentos funcionales ya que, hasta el año 2006, no existía ninguna regulación que limitara los etiquetados con alegaciones saludables en los alimentos. En este reglamento se estableció que cualquier alimento del que se deseara indicar una alegación de salud en su etiquetado debía cumplir los siguientes criterios (Aggett *et al.*, 2005):

- a) El alimento o el ingrediente del que se desee establecer la alegación de salud debe estar adecuadamente caracterizado.
- b) El efecto a alegar debe estar suficientemente comprobado en humanos, mediante la elaboración de estudios de intervención correctamente diseñados y en un grupo representativo de la población general a la que vaya destinado el alimento o ingrediente en cuestión.
- c) La relación entre el consumo del alimento o ingrediente de estudio y su efecto fisiológico debe demostrarse correctamente.

- d) Debe establecerse el mecanismo de acción mediante el cual el alimento o el ingrediente alimentario ejerce su actividad fisiológica.

En la Figura 10 se resumen las fases en las que se divide el desarrollo y elaboración para la obtención de un alimento funcional. Tras el aislamiento del componente o ingrediente y la caracterización de su actividad *in vitro*, es necesario comprobar *in vivo* la actividad del ingrediente en modelos animales que mimeticen las alteraciones fisiológicas que se pretenden mejorar. Los estudios en modelos animales permiten, además, evaluar los posibles mecanismos de acción mediante los cuales el ingrediente funcional podría ejercer su actividad fisiológica, para lo cual se emplean técnicas que permiten evaluar la expresión génica o la síntesis de proteínas marcadoras de interés con el fin de establecer las cascadas o vías de señalización implicadas en los diferentes mecanismos de acción. Finalmente, aunque la utilización de modelos animales permite establecer de forma aproximada la actividad biológica del ingrediente de interés, así como sus posibles mecanismos de acción, es necesario realizar estudios de intervención en humanos que aseguren la efectividad e inocuidad del alimento o ingrediente funcional para la población humana.



**Figura 10.** Fases de desarrollo de un alimento o ingrediente funcional.

Aunque la literatura actual recoge gran cantidad de estudios en los que se evalúa *in vitro* la actividad de hidrolizados y péptidos bioactivos procedentes de proteínas alimentarias, el número de estudios en que se evalúan estos ingredientes *in vivo* en modelos animales es considerablemente menor. Además, varios autores han destacado la gran escasez de estudios de intervención en humanos, imposibilitando la llegada al mercado de estos nuevos alimentos (Eckert *et al.*, 2013; Iwaniak *et al.*, 2018). En la Tabla 9 se resumen los estudios de intervención en humanos realizados

hasta la fecha utilizando hidrolizados proteicos a partir de huevo o sus componentes. La normativa europea exige además, una completa caracterización de los ingredientes alimentarios con actividad fisiológica (Aggett *et al.*, 2005) y, aunque como ya se ha comentado, cada vez son más los investigadores que avalan la utilización de hidrolizados completos frente a péptidos aislados, esta exigencia limita la utilización de hidrolizados complejos para su propuesta como ingrediente bioactivo debido a la complejidad de péptidos que contienen y la dificultad que conlleva la identificación de cada una de estas secuencias en el hidrolizado (Liu *et al.*, 2017).

Teniendo en cuenta toda la información reseñada en esta Introducción, es indiscutible la necesidad de desarrollar ingredientes derivados de los alimentos que ejerzan actividades biológicas que puedan mejorar la salud de la población (Brown *et al.*, 2015; Rochlani *et al.*, 2017). Sin embargo, aunque en la actualidad existen muchas evidencias científicas que avalan la utilización de hidrolizados procedentes de proteínas alimentarias para mejorar o aliviar las alteraciones funcionales y/o metabólicas desarrolladas en múltiples patologías existentes en la sociedad actual, como el síndrome metabólico (Iwaniak *et al.*, 2018), no existe todavía ninguna alegación de salud aprobada por la EFSA en relación al uso de péptidos bioactivos para esta finalidad. Por ello, sigue siendo necesaria la investigación en torno a la obtención de hidrolizados y péptidos bioactivos, y especialmente la realización de más estudios de intervención en humanos que corroboren la seguridad y la eficacia de estos compuestos, que permitan su comercialización para mejorar la calidad de vida y la salud de las personas.



**Tabla 9.** Resumen de los estudios de intervención en humanos realizados hasta la fecha utilizando hidrolizados proteicos a partir de huevo o alguno de sus componentes.

Estructura	Estado de salud de los participantes	Actividad fisiológica a probar	Resultados	Referencia
Huevo completo	Sanos	Estimulación de la secreción de insulina postprandial	Mejora significativa de la síntesis de glucosa en el 100% de los pacientes participantes respecto a la ingesta de placebo.	Claessens <i>et al.</i> (2009)
Clara de huevo-Lisozima	Sanos, sensibles al estrés	Inducción de síntesis de serotonina	Mejora del estado de vigilia y de la respuesta tras un estímulo estresante en aquellos individuos que mostraron menor nivel de estrés basal.	Markus <i>et al.</i> (2010)
Clara de huevo-Lisozima	Sanos	Inducción de síntesis de serotonina	Mejora del estado anímico de los participantes que consumieron el hidrolizado.	Gibson <i>et al.</i> (2014)
Huevo completo	Alérgicos al huevo	Hipo-alérgica	Tolerancia en el 100% de los pacientes del grupo que consumió el hidrolizado.	Giavi <i>et al.</i> (2016)
Huevo completo	Alérgicos al huevo	Hipo-alérgica	Tolerancia en 22 de los 24 participantes del grupo que consumió el hidrolizado.	Ballmer-Weber <i>et al.</i> (2016)
Membrana de cáscara	Osteoporosis	Estimulación de la mineralización de los huesos	Reducción del dolor crónico en el 100% de los pacientes participantes.	Görögh <i>et al.</i> (2017)
Clara de huevo-Lisozima	Sanos, hipertensos	Antihipertensiva	Reducción significativa de la presión arterial del grupo de pacientes hipertensos tras 7 días de tratamiento.	Plat <i>et al.</i> (2017)

# 2

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Nuestra hipótesis de trabajo se basó en que la administración oral de un hidrolizado de clara de huevo con pepsina previamente seleccionado por su actividad biológica podría ser de utilidad para prevenir y/o mejorar simultáneamente algunas de las alteraciones cardiometabólicas asociadas al síndrome metabólico.

El objetivo global del presente trabajo fue evaluar el efecto de la administración de un hidrolizado de clara de huevo con pepsina previamente seleccionado por sus actividades *in vitro* e *in vivo* sobre algunas de las complicaciones asociadas al síndrome metabólico, en un modelo animal de obesidad inducida por dieta y en pacientes humanos con síndrome metabólico.

Para conseguir el objetivo propuesto se llevó a cabo el siguiente plan de trabajo:

- 1) Seleccionar el modelo animal de obesidad inducida por dieta en el que se desarrollen la mayor parte de las alteraciones o complicaciones asociadas al síndrome metabólico humano.
- 2) Evaluar el efecto de la administración del hidrolizado de clara de huevo con pepsina sobre el modelo animal de obesidad inducida por dieta seleccionado e investigar el/los posible/s mecanismo/s de acción implicado/s en su actividad biológica. Para ello se evaluó el efecto del hidrolizado sobre:
  - La ingesta y la composición corporal
  - El desarrollo de estrés oxidativo e inflamación
  - El metabolismo de la glucosa
  - El metabolismo lipídico
- 3) Evaluar el efecto de la administración del hidrolizado de clara de huevo con pepsina sobre sujetos humanos con diagnóstico de síndrome metabólico. Para ello se evaluó el efecto del hidrolizado sobre:
  - El peso y la composición corporal
  - Los marcadores sanguíneos del metabolismo de la glucosa
  - Los marcadores sanguíneos del metabolismo lipídico
  - La presión arterial

# 3

MATERIALES Y  
MÉTODOS

En esta Tesis Doctoral se han llevado a cabo dos estudios utilizando como modelo experimental la rata Wistar. El primero de ellos tuvo como objetivo seleccionar un modelo animal de obesidad inducida por dieta que reuniera el mayor número de alteraciones posibles asociadas al síndrome metabólico. Para ello, se utilizaron ratas Wistar a las que se les administró, durante un total de 20 semanas, una dieta con alto contenido en grasa y azúcar. Durante el estudio se registraron parámetros como el peso corporal, las ingestas sólida y líquida y el desarrollo de neuropatía periférica. Al finalizar el periodo experimental se evaluó en los animales la presión arterial. Posteriormente, los animales se sacrificaron y se recogieron muestras de sangre y diferentes órganos para realizar distintas determinaciones.

El segundo estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de la administración de un hidrolizado de clara de huevo previamente seleccionado por su multiactividad *in vitro* e *in vivo* (Garcés-Rimón *et al.*, 2016a; Garcés-Rimón *et al.* 2016b), sobre el modelo experimental de obesidad inducido por dieta seleccionado. En esta segunda fase, el hidrolizado de clara de huevo con pepsina se administró a partir de la novena semana de estudio. Los registros de peso, ingestas y desarrollo de neuropatía periférica se realizaron siguiendo los mismos protocolos del primer estudio. Asimismo, los animales se sacrificaron y se recogieron muestras de sangre y órganos para realizar distintas determinaciones con el objetivo de profundizar en los posibles mecanismos de acción a través de los cuales ejerce su actividad biológica el hidrolizado de la clara de huevo.

Finalmente, la última etapa de la presente Tesis Doctoral consistió en la evaluación clínica del efecto del hidrolizado de clara de huevo con pepsina sobre individuos con síndrome metabólico. Para ello, se diseñó un ensayo clínico aleatorizado doble ciego, controlado por placebo en el cual se seleccionaron pacientes diagnosticados de síndrome metabólico. En este estudio los individuos fueron aleatoriamente asignados para recibir el hidrolizado de clara de huevo o placebo, respectivamente. Tanto el hidrolizado de clara de huevo como el placebo se administraron a los pacientes en forma liofilizada, durante un total de 12 semanas. Durante todo el periodo de estudio se realizó el seguimiento de los pacientes. Al inicio del estudio y cada dos semanas después del inicio del mismo, se evaluaron en los

pacientes los niveles de presión arterial, el peso corporal, el perímetro abdominal y la posible aparición de efectos adversos. Se realizaron además en los pacientes 3 extracciones de sangre en diferentes momentos del estudio con el objetivo de evaluar el efecto del consumo del hidrolizado de clara de huevo sobre distintos marcadores cardiometabólicos. En la Figura 11 se muestra un esquema de los diferentes estudios experimentales realizados en esta Tesis Doctoral.

<b>a) Elaboración del HCH</b> (Garcés-Rimón <i>et al.</i> , 2016b)			
Pepsina		37 °C	8 horas
<b>b) Primer estudio en animales - Selección del modelo de DIO</b>			
Control	Dieta grasa	Dieta grasa + fructosa	Dieta grasa + glucosa
<b>c) Segundo estudio en animales – Evaluación de la actividad del HCH en un modelo de DIO</b>			
Control + HCH		Dieta grasa + glucosa + HCH	
<b>d) Estudio de Intervención en Humanos</b>			
Hospital de la Defensa Gómez Ulla			

**Figura 11.** Fases principales en que se dividen los experimentos realizados en la presente Tesis Doctoral. DIO: Obesidad Inducida por Dieta; HCH: Hidrolizado de Clara de Huevo.

### 3.1. Obtención del hidrolizado de clara de huevo con pepsina

La obtención del hidrolizado de clara de huevo con pepsina se realizó siguiendo el protocolo previamente establecido por Garcés-Rimón *et al.* (2016b). Se empleó como sustrato clara de huevo pasteurizada de origen comercial (Guillén, España). La hidrólisis se llevó a cabo con pepsina de grado alimentario procedente de estómago de

cerdo (BC Pepsin 1:3000; Biocatalysts, Reino Unido). Las condiciones óptimas de hidrólisis se seleccionaron en base a las especificaciones del fabricante.

En primer lugar se redujo el pH de la clara de huevo a 2, utilizando HCl 37% de grado alimentario (Panreac, España). Posteriormente, se añadió la enzima en una concentración de 2:100 (p/p). La hidrólisis se realizó en un baño termostático a 37 °C, con agitación constante, durante 8 horas. La inactivación se consiguió elevando el pH a 7 con NaOH 10 M de grado alimentario (Panreac).

El hidrolizado inactivado se centrifugó a 5000 G durante 15 minutos. El sobrenadante resultante se recogió y se almacenó congelado hasta su utilización para el estudio en animales. Para su uso en el estudio de intervención en humanos, el hidrolizado se liofilizó, se almacenó al vacío y permaneció congelado a -80 °C hasta su administración a los pacientes.

### **3.2. Protocolo general del estudio en ratas**

Los experimentos con animales llevados a cabo en esta Tesis Doctoral se diseñaron con el objeto de minimizar el número de animales utilizados y su sufrimiento, de acuerdo con la Regulación de la Comisión Europea para el cuidado y empleo de animales de experimentación (86/609/CEE) y el Real Decreto 53/2013 del 1 de febrero sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Todos los protocolos experimentales fueron además aprobados por el Comité Ético de la Universidad Rey Juan Carlos (CEI 39/2012).

Para llevar a cabo los dos estudios experimentales planteados, se utilizaron un total de 46 ratas Wistar macho de 8-9 semanas de vida con un peso comprendido entre 280 y 310 g (Harlan Laboratories, Estados Unidos). Los animales llegaron al animalario de la Universidad Rey Juan Carlos y, después de un periodo de adaptación, se colocaron en grupos de 2 a 3 animales en jaulas transparentes (40 cm x 28 cm x 25 cm), con un lecho de viruta que fue reemplazado cada 4-5 días y se mantuvieron en condiciones controladas, con una temperatura ambiental estable de 23 °C, humedad del 60% y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. Los animales se alimentaron *ad libitum*

durante todo el estudio y consumieron agua corriente filtrada que fue renovada periódicamente.

Al comienzo del primer estudio, las ratas ( $n = 29$ ) se dividieron en 2 grupos a los que se les administró, respectivamente y durante todo el estudio: dieta sólida estándar (A04, SAFE, Francia) y agua en el biberón (grupo control = C;  $n=7$ ), y una dieta rica en grasa (Purified Diet 235 HF, SAFE, Francia;  $n=22$ ), respectivamente. El grupo de animales alimentados con una dieta rica en grasa se dividió a su vez en 3 subgrupos de animales que ingirieron como producto líquido respectivamente: agua (grupo dieta grasa = DG;  $n=6$ ), una solución de fructosa (Duo Harinero, España) al 25% (grupo dieta grasa + fructosa = DGf;  $n=6$ ) o una solución de glucosa (Duo Harinero, España) al 25% (grupo dieta grasa + glucosa = DGg,  $n=10$ ). La composición nutricional y contenido calórico de cada grupo de dieta se detalla en la Tabla 10.

Al comienzo del segundo estudio, las ratas ( $n = 17$ ) se dividieron en 2 grupos a los que se les administró, respectivamente: una dieta sólida estándar (A04, SAFE, Francia) con una solución del hidrolizado de clara de huevo con pepsina (grupo control + hidrolizado = CH;  $n=7$ ), y una dieta rica en grasa (Purified Diet 235 HF, SAFE, Francia) con un 25% de glucosa en el agua de bebida a la que se añadió además una solución del hidrolizado de clara de huevo con pepsina (grupo dieta grasa + glucosa + hidrolizado = DGgH;  $n=10$ ). El tratamiento con hidrolizado se inició en la semana 9 de estudio y continuó hasta la finalización del periodo experimental. La concentración del hidrolizado se ajustó semanalmente para que los animales recibiesen una dosis diaria de 1 g/kg·día, teniendo en cuenta el peso de los animales y el volumen de líquido ingerido la semana anterior.



**Tabla 10.** Composición nutricional y contenido calórico de las dietas administradas a los diferentes grupos experimentales del primer estudio en animales.

Dieta grupo C		Dieta grupo DG	
Energía (por 100 g de dieta)	290 kcal	Energía (por 100 g de dieta)	439.7 kcal
Carbohidratos	60%	Carbohidratos	42.3%
Proteínas	16%	Proteínas	17%
Grasas	3%	Grasas	22.5%
Fibra	4%	Fibra	3.2%
Minerales	5%	Minerales	5%
Humedad	12%	Humedad	10%
Dieta grupo DGf		Dieta grupo DGg	
Energía (por 100 g de dieta)	439.7 kcal	Energía (por 100 g de dieta)	439.7 kcal
Carbohidratos	42.3%	Carbohidratos	42.3%
Proteínas	17%	Proteínas	17%
Grasas	22.5%	Grasas	22.5%
Fibra	3.2%	Fibra	3.2%
Minerales	5%	Minerales	5%
Humedad	10%	Humedad	10%
Agua + 25% fructosa		Agua + 25% glucosa	
Energía (por 100 ml de bebida)	100 kcal	Energía (por 100 ml de bebida)	91.3 kcal

A continuación se detalla el protocolo experimental, que fue similar para ambos estudios (Figura 12) y, más adelante, en el apartado 3.2.1, se describen detalladamente los métodos y/o técnicas llevadas a cabo durante la realización de ambos estudios.

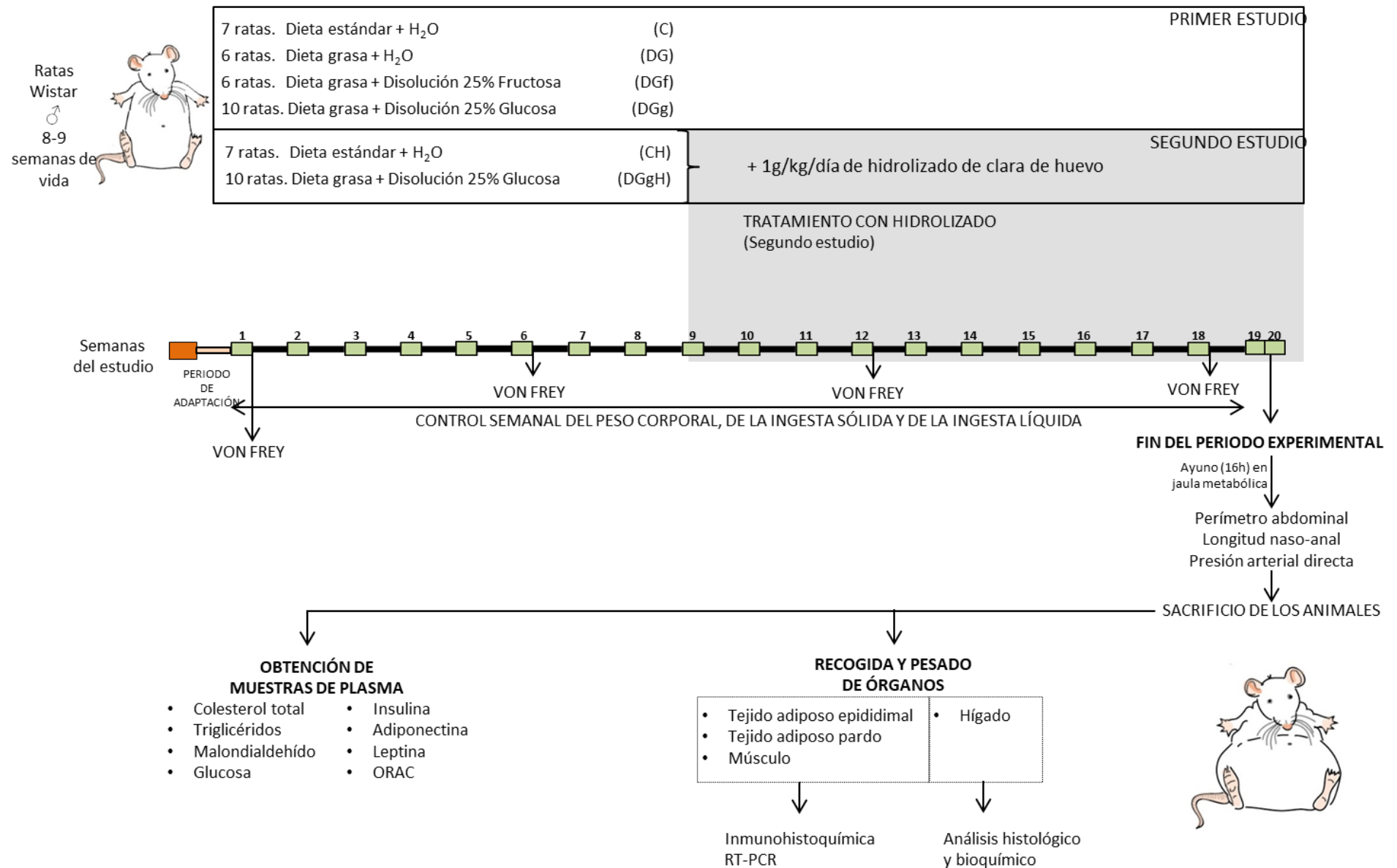
Durante todo el periodo experimental se controló semanalmente el peso corporal, la ingesta sólida y la ingesta líquida de los animales. Además, cada 6 semanas se llevó a cabo el estudio de desarrollo de neuropatía sensorial mediante el test de filamentos de Von Frey, cuya metodología se explica en el apartado 3.2.1.1. Al finalizar el periodo experimental, las ratas se mantuvieron durante 16 horas en jaulas metabólicas y se recogieron muestras de orina y heces para análisis posteriores. A continuación, y tras un periodo de ayuno de 16 horas, las ratas se anestesiaron con equitesin (sulfato de magnesio 1.06 g; pentobarbital 0.46 g; propilenglicol 21.4 mL; hidrato de cloral 2.1 g; etanol absoluto 5.7 mL; 0.3 mL/kg; i.p.). Posteriormente, se midió el perímetro abdominal y la longitud naso-anal de los animales. Los datos del

peso y la longitud naso-anal se utilizaron para realizar el cálculo del IMC de los animales utilizando la fórmula indicada a continuación. Finalmente, se registró la presión arterial en los animales siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2.1.2.

$$\text{IMC} = \frac{\text{Peso (g)}}{\text{Longitud naso – anal (cm)}^2}$$

Después de realizar la medida de la presión arterial, los animales se sacrificaron por decapitación con guillotina. Se recogieron muestras de sangre en tubos que contenían heparina de litio como anticoagulante (BD Vacutainer CPT, Reino Unido). Las muestras de sangre se centrifugaron a 1500 G, 10 minutos y el plasma obtenido se alicuotó y se congeló a -80 °C hasta su uso para efectuar varias determinaciones bioquímicas según se describe en el apartado 3.2.1. Seguidamente, se extrajeron el hígado, el tejido adiposo blanco epididimal, el tejido adiposo pardo interescapular, el tejido muscular procedente del sóleo, y la tibia. Todos los órganos se limpiaron, se pesaron y se procesaron según el protocolo correspondiente a cada uno de ellos. El peso relativo de cada uno de los órganos se calculó dividiendo el peso de cada órgano por la longitud en centímetros de la tibia del animal. Una muestra de cada uno de estos tejidos se guardó en paraformaldehído al 10% para realizar estudios histológicos, y otra muestra se almacenó congelada a -80 °C para realizar otras determinaciones (Figura 12).

## Materiales y Métodos



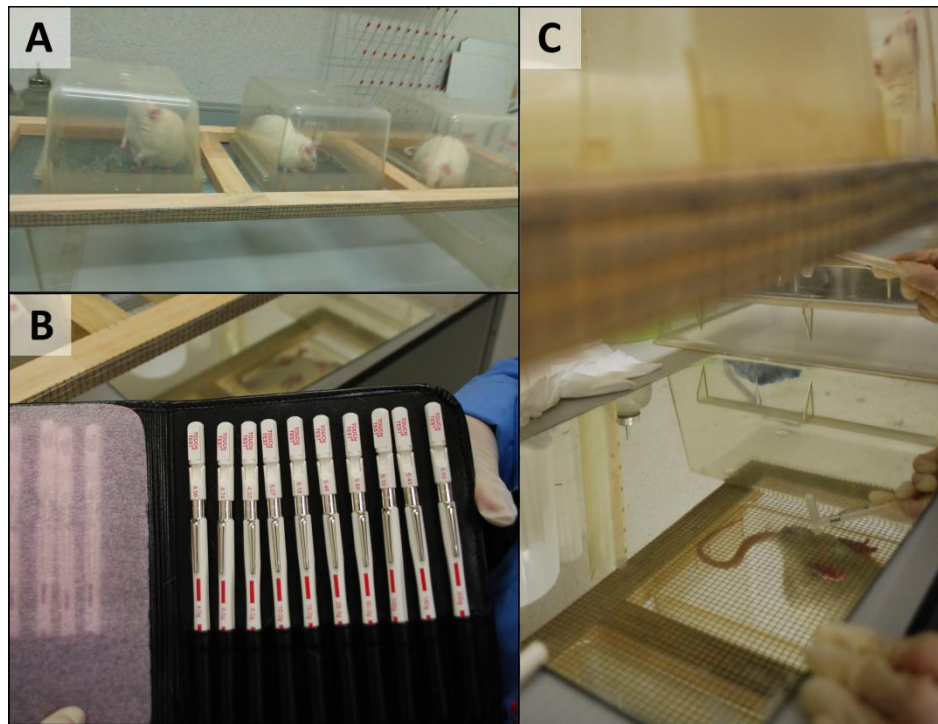
**Figura 12.** Esquema del protocolo experimental empleado durante los dos estudios realizados en ratas.

### 3.2.1. Determinaciones y técnicas utilizadas en los estudios en ratas

#### 3.2.1.1. Estudio de la neuropatía diabética. Método de Von Frey

La sensibilidad mecánica y el desarrollo de alodinia táctil se evaluaron en las semanas 1, 6, 12 y 18 del periodo experimental en ambos estudios. Para ello, se midió el umbral de retirada a filamentos de Von Frey calibrados con intensidades crecientes, como previamente describió Fox *et al.* (2001). Se utilizaron filamentos de nylon de distinto grosor y longitud, capaces de generar una presión de intensidad variable (4, 8, 10, 15, 26 y 60 g) y se aplicaron directamente sobre la superficie plantar de cada una de las patas traseras de los animales. No se utilizaron presiones superiores a 60 g puesto que esta presión era suficiente para elevar (*per se*) la pata del animal.

El día previo y 10 minutos antes de la realización de esta prueba, las ratas se situaron sobre una malla metálica durante un mínimo de diez minutos, para permitir la adaptación del animal al medio en el que se realizó el test (Figura 13). Se aplicó cada filamento, comenzando por el de menor presión, de manera perpendicular a la superficie de las patas traseras con una fuerza suficiente para curvar ligeramente el filamento. Cada filamento fue aplicado 5 veces en cada pata trasera durante aproximadamente 1 segundo, y dejando al menos 3 segundos entre cada aplicación. Se consideró una respuesta positiva cuando el animal retiraba la pata brusca e inmediatamente al menos en tres de las cinco ocasiones (60%). Este valor se aceptó como el umbral táctil (Cabezos *et al.*, 2010).



**Figura 13.** Representación del Test de los filamentos de Von Frey. (A) Las ratas se adaptaron a la malla metálica durante al menos 10 minutos previos a la realización del test. (B) Filamentos de Von Frey calibrados por intensidades. (C) Cada filamento se aplicó, en orden de intensidad creciente con una intensidad suficiente para curvar ligeramente cada filamento.

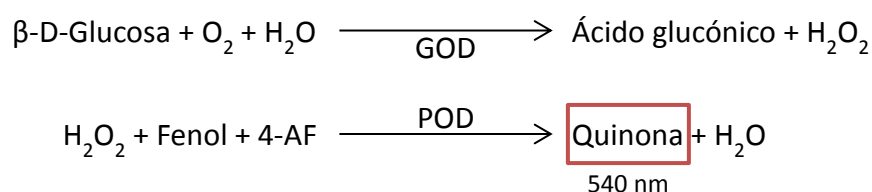
### 3.2.1.2. Medida de la presión arterial directa

La medida de la presión arterial se realizó mediante una técnica invasiva que permite obtener medidas directas tras la implantación de un catéter en la arteria carótida del animal (López-Miranda *et al.*, 2015). Para ello, en primer lugar, los animales se anestesiaron con equitesin y se colocaron en posición decúbito supino sobre una cama. Posteriormente, se realizó una incisión en la zona ventromedial del cuello y se procedió a separar y cortar la piel, dejando un campo quirúrgico en forma de ojal lo suficientemente amplio para las manipulaciones posteriores. A través del ojal, se separaron los paquetes musculares hasta lograr acceder al paquete vasculo-nervioso formado por la arteria carótida y el nervio vago. Se separó dicho nervio y, una vez aislada la arteria, se pasaron por debajo de ésta dos hilos, ligando uno en la parte distal, y dejando iniciado el nudo en la parte proximal para la posterior ligadura de la cánula. Una vez preparada la carótida, se colocó una pinza de arteria por encima del nudo iniciado en la parte proximal. Esta pinza tenía como misión interrumpir la

circulación para permitir realizar una pequeña incisión a través de la cual se introdujo una cánula de PVC. Una vez colocada la cánula, se soltó la pinza para reestablecer de nuevo la circulación. Para evitar la coagulación sanguínea durante el ensayo, a través de la cánula se inyectó heparina sódica (10µL/rata) (Hospira Productos Farmacéuticos y Hospitalarios S.L. España) disuelta en 0.4 mL de suero fisiológico. Una vez realizada la canulación, se registraron de manera continuada, durante 10 minutos, los siguientes parámetros: presión arterial media (PAM), presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD) y frecuencia cardíaca (FC). Los resultados de presión arterial se expresaron en mmHg y los resultados de frecuencia cardíaca se expresaron en pulsaciones por minuto (ppm).

### 3.2.1.3. Determinación de glucosa en plasma

Para obtener los valores de glucosa en plasma se utilizó un kit comercial basado en métodos enzimático-colorimétricos (Spinreact S.A/S.A.U, España) y se siguieron las indicaciones proporcionadas por el fabricante. A continuación se detalla el fundamento del kit. El método enzimático utiliza la glucosa oxidasa para catalizar la oxidación de la glucosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido reacciona con 4-aminofenazona (4-AF) y fenol en presencia de la enzima peroxidasa, dando lugar a la quinona, un compuesto coloreado que absorbe a una longitud de onda de 540 nm (Figura 14). La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra de plasma (Trinder, 1969).



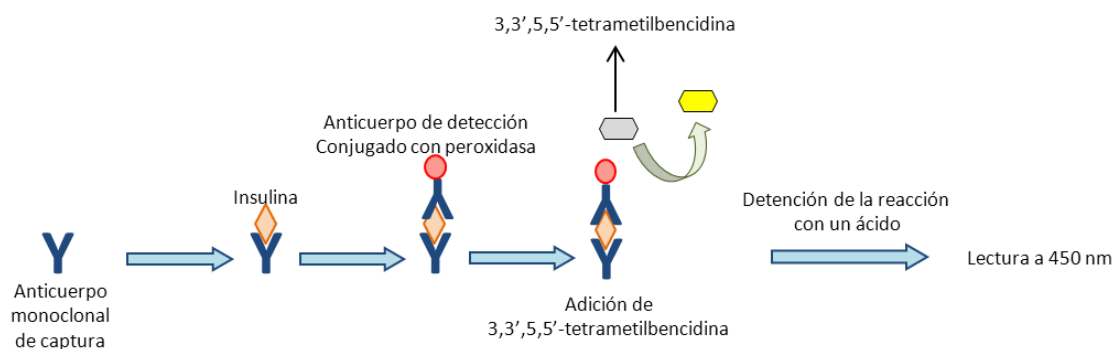
**Figura 14.** Esquema de la cadena de reacciones catalizadas por las enzimas glucosa oxidasa (GOD) y peroxidasa (POD) durante la determinación del contenido de glucosa en plasma. 4-AF: 4-aminofenazona.

La absorbancia producida por cada una de las muestras se midió a 540 nm en un espectrofotómetro (Biotek HT Synergy, Estados Unidos). Los resultados se expresaron como mg de glucosa/dL de plasma.

#### 3.2.1.4. Determinación de insulina en plasma

Para determinar la concentración de insulina plasmática se utilizó un ensayo inmunoenzimático (ELISA) de tipo directo con un kit comercial ultrasensible específico para rata (Mercodia AB, Suecia), y se siguieron las indicaciones del fabricante.

Durante el proceso, la insulina presente en las muestras de plasma se une a los anticuerpos anti-insulina unidos a la placa multipocillo. Posteriormente, se adicionan anticuerpos de unión específica a insulina conjugados con peroxidasa, que se unen a la insulina retenida. El conjugado formado se detecta mediante la reacción del sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina por acción de la peroxidasa, originando un compuesto de color amarillo. La reacción se detiene por la adición de ácido, y la lectura se realiza a 450 nm con un espectrofotómetro (Biotek HT Synergy, Estados Unidos) (Figura 15). Los niveles de insulina en el plasma se expresaron en  $\mu\text{g}$  de insulina/L de plasma.



**Figura 15.** Fundamento del ensayo ELISA directo. Representación de las reacciones en cadena que se producen para cuantificar la insulina presente en el plasma.

Cálculo del índice HOMA-IR:

El valor de la concentración plasmática de insulina, junto con el valor de la concentración plasmática de glucosa en los animales sacrificados, se utilizaron para

calcular el índice de resistencia a la insulina [“homeostasis model assessment” (HOMA)-IR] (Ferrannini y Mari, 1998). La fórmula que proporciona los valores del índice mencionado figura a continuación:

$$\text{HOMA-IR} = \text{Insulina en ayunas } (\mu\text{U/mL}) \cdot \frac{\text{Glucosa en ayunas (mM)}}{22.5}$$

#### 3.2.1.5. *Determinación de malondialdehído en plasma*

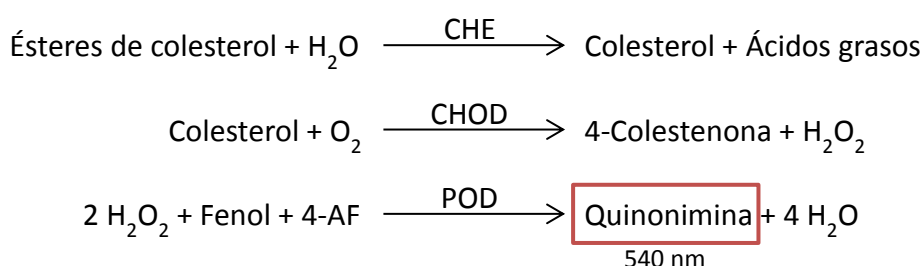
Para determinar los niveles de malondialdehído (MDA) en el plasma de las ratas se utilizó el ensayo modificado del ácido tiobarbitúrico (TBA), descrito por Rodríguez-Martínez y Ruiz-Torres (1992). Para ello, inicialmente el plasma se mezcló con ácido tricloroacético al 20% en 0.6 M HCl (1:1 v/v), y a continuación los tubos se mantuvieron en hielo durante 20 minutos para precipitar los componentes del plasma, evitando así posibles interferencias. Las muestras se centrifugaron a 1500 G durante 15 minutos. A continuación, se añadió el TBA (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) (120 mM en Tris 260 mM; pH 7) al sobrenadante en una proporción 1:5 (v/v), y la mezcla se calentó a 97 °C durante 30 minutos. La reacción entre MDA y TBA produce un pigmento estable de color rojo-rosáceo, con un coeficiente de absorción molar de  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  en el espectro visible (535 nm). En este aducto, la proporción MDA:TBA es de 1:2. Para la medida de la absorbancia a 535 nm se utilizó un espectrofotómetro (Biotek HT Synergy, Estados Unidos). Las concentraciones de MDA en plasma se expresaron como nmol de MDA/mL de plasma.

#### 3.2.1.6. *Determinación de colesterol y triglicéridos en plasma*

Para obtener los valores de colesterol total y triglicéridos en plasma se utilizaron kits comerciales basados en métodos enzimático-colorimétricos (Spinreact S.A/S.A.U, España) y se siguieron las indicaciones del fabricante. A continuación se explica el fundamento de cada kit:

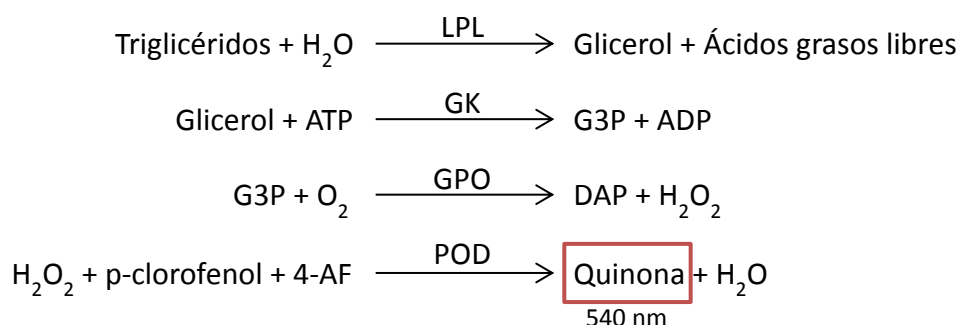


*Determinación de colesterol total en plasma.* El colesterol presente en las muestras de plasma se determinó por un método enzimático. La enzima colesterol esterasa hidroliza los ésteres de colesterol a colesterol libre y el ácido graso correspondiente. Éste último, en presencia de la enzima colesterol oxidasa y oxígeno, se oxida para formar 4-Colestenona y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Finalmente, en una reacción catalizada por peroxidasa, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  reacciona con el 4-AF para formar quinonimina, un compuesto de color rosáceo (Figura 16). La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra de plasma (Meiattini *et al.*, 1978; Naito y David, 1984). Los resultados se expresaron como mg de colesterol/dL de plasma.



**Figura 16.** Esquema de la cadena de reacciones catalizadas por las enzimas colesterol esterasa (CHE), colesterol oxidasa (CHOD) y peroxidasa (POD) durante la determinación del contenido de colesterol en plasma. 4-AF: 4-aminofenazona.

*Determinación de triglicéridos en plasma.* La determinación de los triglicéridos (TG) presentes en las muestras de plasma se calculó mediante un método enzimático basado en la hidrólisis de los triglicéridos a glicerol y ácidos grasos libres, por la acción de la lipoproteinlipasa. El glicerol se fosforila por la presencia de la enzima glicerol quinasa dando lugar, en presencia de ATP, a glicerol-3-fosfato y adenosina-5-difosfato (ADP). El G3P reacciona con el oxígeno dando lugar a dihidroxiacetona fosfato y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , por acción de la enzima glicerol fosfato oxidasa. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  reacciona finalmente con la 4-AF y el p-clorofenol en una reacción catalizada por enzima peroxidasa, produciendo un compuesto de coloración rosácea (Figura 17). La intensidad del color formado es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra de plasma (Fossati y Prencipe, 1982). Los resultados se expresan como mg de triglicéridos/dL de plasma.



**Figura 17.** Esquema de la cadena de reacciones catalizadas por las enzimas lipoproteinlipasa (LPL), glicerol quinasa (GK), glicerol fosfato oxidasa (GPO) y peroxidasa (POD) durante la determinación del contenido de triglicéridos en plasma. 4-AF: 4-aminofenazona; ADP: Adenina difosfato; ATP: Adenina trifosfato; G3P: Glicerol-3-fosfato.

### 3.2.1.7. Determinación de leptina y adiponectina en plasma

Para determinar las concentraciones plasmáticas de leptina y adiponectina se usaron kits de ELISA directos específicos para rata (Cusabio, Estados Unidos), y se siguieron las indicaciones específicas del fabricante para cada kit. El fundamento de esta técnica es el mismo que el que se ha descrito en el apartado 3.2.1.4. La cuantificación se llevó a cabo a una longitud de onda de 450 nm con un espectrofotómetro (Biotek HT Sinergy, Estados Unidos). Los resultados se expresaron como ng de leptina/mL de plasma y µg de adiponectina/mL de plasma.

### 3.2.1.8. Medida de la capacidad antioxidante del plasma

Para determinar la actividad antioxidante, se utilizó el ensayo ORAC (Cuantificación de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno, por sus siglas en inglés: *Oxygen radical absorbance capacity*). El protocolo se llevó a cabo según el método descrito por Ou *et al.* (2001), modificado por Dávalos *et al.* (2004). El ensayo ORAC mide la capacidad de los antioxidantes presentes en el plasma para neutralizar los radicales peroxilo originados a partir de la descomposición térmica del 2,2'-azo-bis-(2-metilpropionamidina) dihidrocloruro (AAPH) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), y que causan la oxidación de la fluoresceína que actúa como sustrato. Como antioxidante de

referencia se utilizó el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), análogo soluble de la vitamina E. Todos los reactivos utilizados en el ensayo se diluyeron en tampón fosfato (75 mM, pH 7.4). El trolox se diluyó para obtener diferentes concentraciones (2.5 – 20 µg/mL) con las que se construyó una curva de calibrado de referencia. Cada muestra (por triplicado) y la curva de trolox se incubaron (10 minutos, 37 °C) con solución de fluoresceína disodio (116.6 nM). Tras esta incubación, se añadió AAPH (48 mM). La reacción se llevó a cabo en placas multipocillo de poliestireno negras (Corning, Estados Unidos) durante un total de 95 minutos a 37 °C. La fluorescencia se midió de forma continuada durante todo el tiempo de reacción, en un fluorímetro (Fluostar Optima, BMG Labtech, Alemania), utilizando una longitud de onda de excitación de 485 nm y 520 nm de emisión. A partir de las curvas resultantes se calculó el área bajo la curva (AUC) de descenso de fluorescencia utilizando la siguiente fórmula:

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=104} \frac{f_i}{f_0}$$

Donde  $f_0$  es la lectura de la fluorescencia inicial y  $f_i$  es la lectura de fluorescencia después de  $i$  minutos. Los valores de AUC de todas las muestras se normalizaron con respecto a un blanco (sin antioxidante) y se extrapolaron en la curva de calibrado del trolox.

Se llevaron a cabo al menos tres ensayos independientes para cada muestra y se tomó como resultado válido el promedio de los tres valores obtenidos siempre y cuando la desviación estándar de éste promedio no superara el 10% del resultado obtenido. Los resultados de ORAC se expresaron como µmol equivalentes de trolox/mL de plasma.

### 3.2.1.9. Homogeneización y determinación de glutatión reducido en hígado

Para realizar las determinaciones de glutatión reducido, las muestras de hígado se homogeneizaron en tampón fosfato pH 7.4 (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) a 4 °C utilizando un homogeneizador de vidrio. Los homogeneizados se centrifugaron

posteriormente a 15000 G, 4 °C durante 15 minutos y se recogieron los sobrenadantes que se almacenaron a -80 °C hasta su análisis.

El contenido de glutatión reducido en las muestras homogenizadas se determinó por el método fluorimétrico monoclorobimane (Kamencic *et al.*, 2000). Para ello, 90 µL del sobrenadante de homogeneizado de hígado se depositaron en una placa multipocillo de poliestireno negra, y se añadieron 10 µL de una solución que contenía glutatión S-transferasa (1 U/mL) procedente de hígado de caballo (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y monoclorobimane (1 mM) (Fluka Biochemical, Suiza). La placa se incubó a temperatura ambiente protegida de la luz durante 30 minutos. Durante la incubación el glutatión se une al monoclorobimane, generando un complejo fluorescente en una reacción catalizada por la enzima glutatión S-transferasa. La intensidad de fluorescencia producida por los complejos formados es directamente proporcional a la cantidad de glutatión presente en la muestra. Cada muestra se midió por duplicado y se utilizó una curva de calibrado de glutatión reducido (0.07 – 20 mM) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) como referencia. La fluorescencia producida tras la reacción se midió en un fluorímetro (Fluostar Optima, BMG Labtech), utilizando una longitud de onda de excitación de 390 nm y 510 nm de emisión. Tras este procedimiento fue necesario medir la cantidad de proteínas presente en las muestras, utilizando para ello un kit comercial (DC Protein Assay, BioRad, Estados Unidos) basado en el método colorimétrico de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), modificado por Peterson (1979). Los resultados se expresaron como µmol glutatión reducido/g de proteína.

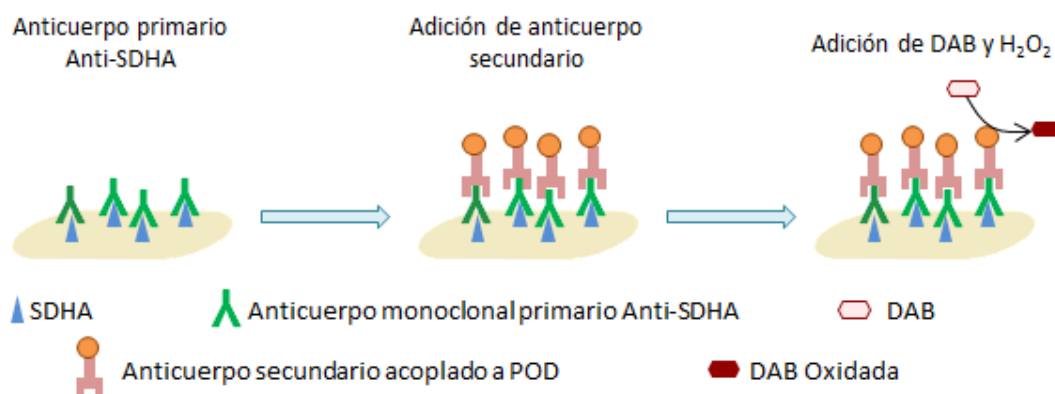
### 3.2.1.10. Estudios histológicos

Al finalizar el periodo experimental, se recogieron muestras de hígado, tejido adiposo epididimal (blanco) y tejido adiposo interescapular (pardo) para realizar estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos. Todos los tejidos se fijaron en solución de formaldehído al 10% en PBS inmediatamente después de su extracción y durante un mínimo de 48 h. Tras su fijación, se embebieron en parafina utilizando un procesador automático Thermo Shandon (Thermo Fisher Scientist, Estados Unidos) y se cortaron con un micrótopo Microm (MICROM International GmbH, Alemania) en

secciones de 5µm. A continuación, las preparaciones se tiñeron según el protocolo especificado a continuación para cada tipo de muestra:

Las preparaciones de hígado, tejido adiposo epididimal y tejido adiposo interescapular se tiñeron con hematoxilina-eosina para su estudio general. Para ello, las preparaciones se sumergieron en una solución de hematoxilina durante 10 minutos. Posteriormente se realizó un lavado de 15 minutos en agua corriente, y a continuación las muestras se lavaron con agua destilada durante 5 minutos. Por último, las muestras se contrastaron sumergiéndolas en una solución acuosa de eosina al 0.2% durante 3 minutos.

En las preparaciones de tejido adiposo interescapular se realizó una tinción inmunohistoquímica específica para mitocondrias. Para ello, se utilizó un anticuerpo primario monoclonal específico del complejo mitocondrial succinato deshidrogenasa de rata (Abcam, Reino Unido). Para evitar uniones inespecíficas se utilizó albúmina de suero bovino. Tras la adición del anticuerpo primario, se procedió a la adición de un anticuerpo secundario, que se unió específicamente al anticuerpo primario. Este anticuerpo secundario se encontraba conjugado con enzima peroxidasa. La tinción específica de las mitocondrias de la muestra se consiguió mediante la adición de  $H_2O_2$  y diaminobenzidina, los cuales, al ser catalizados por la enzima peroxidasa producen un compuesto coloreado e insoluble (Figura 18). Por último, las preparaciones se tiñeron con hematoxilina para aumentar el contraste de la tinción.



**Figura 18.** Representación esquemática del ensayo inmunohistoquímico realizado en las preparaciones de tejido adiposo interescapular. DAB: Diaminobenzidina; POD: Enzima peroxidasa; SDHA: Succinato deshidrogenasa.

La observación de todas las preparaciones se realizó con un microscopio Zeiss Axioskop 2 (Zeiss MicroImaging GmbH, Alemania) equipado con el programa de análisis de imagen AxioVision 6.4 (Zeiss MicroImaging GmbH, Alemania).

### **3.2.2. Evaluación de la expresión génica relativa mediante RT-qPCR**

La expresión génica relativa se midió en muestras de tejido adiposo epididimal (blanco), tejido adiposo interescapular (pardo) y tejido muscular procedente del sóleo. Estas muestras se recogieron al finalizar el periodo experimental e inmediatamente se congelaron a -80 °C hasta su utilización. El ARN total de las muestras se extrajo utilizando el kit comercial Tri-Reagent (MRC, Estados Unidos), siguiendo las indicaciones del fabricante. Este kit está basado en la técnica de extracción Trizol-cloroformo previamente descrita por Chomczynsky y Sacchy (1987). Las muestras se homogeneizaron utilizando un lisador de tejidos (MM300, Retsch, Alemania). El ARN total extraído se cuantificó con un BioDrop (BioDrop  $\mu$ Lite, Biodrop, Reino Unido). Para sintetizar el ADN complementario (ADNc) se utilizó transcriptasa inversa (M-MLV, Invitrogen, Estados Unidos) 200 U/ $\mu$ L y se utilizó como referencia 1  $\mu$ g de ARN total.

La cuantificación de la expresión génica relativa se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de tipo cuantitativo (qPCR) a partir de 25 ng del ADNc previamente sintetizado. Para la realización de este protocolo y cuantificación de la amplificación se utilizó el agente fluorescente de unión específica a ADN de doble cadena SYBRgreen (SYBRgreen MasterMix, Eurogentec, Francia). La reacción se llevó a cabo en un termociclador a tiempo real (MX3005P Real-Time PCR System, Stratagene, Estados Unidos) provisto del software MxPro (MxPro qPCR software, Agilent Technologies, Estados Unidos). Las condiciones térmicas incluyeron 1 ciclo de 2 minutos a 50 °C seguido por 1 ciclo de 10 minutos a 95 °C y, finalmente, 40 ciclos de amplificación consistentes en: una fase de desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos y una fase de extensión a 60 °C durante 1 minuto. Los cebadores utilizados para la evaluación específica de la expresión génica están representados en la Tabla 11. Estos cebadores se diseñaron utilizando el software online Universal ProbeLibrary

(Roche, Francia) y se validaron siguiendo las indicaciones de Rodríguez *et al.*, (2015). La expresión génica relativa se calculó normalizando los resultados obtenidos con la expresión somática del gen 18S, que fue utilizado como calibrador tal y como describieron Livak y Shmittgen (2001). Todas las reacciones de amplificación se realizaron por duplicado.

**Tabla 11.** Secuencias de los cebadores utilizados para evaluar la expresión génica en muestras de tejido adiposo epididimal, tejido adiposo interescapular y tejido muscular.

Gen	Nombre completo	Secuencia en sentido 5'→3'
18S	ARN ribosomal 18S	D: cgccgctagaggtgaaattct R: cattcttggaatgctttcg
ACC	Acetil CoA carboxilasa	D: gatgatcaaggccagcttgt R: caggctaccatgccaatctc
ACO	Acetil CoA oxidasa	D: caccttcgaggagagaaca R: cgcacctggctcgtagatttt
Adiponectina	Adiponectina	D: tggtcacaatgggataccg R: cccttaggaccaagaacacct
CIDEA	Activador de muerte celular CIDE-A	D: tgatatccgctgcacaagc R: cacctgggcagcatagga
Cox1	Citocromo C oxidasa subunidad 1	D: tcggaaccctctacattatttg R: ctcgaattagaataacttaagctgtcc
Cpt1B	Carnitina palmitoiltransferasa 1B	D: ctctttcttgacgaggt R: gatctggaactgggggatct
CycloA	Ciclofilina A	D: ccccatctgctcgcaata R: ttgcaatcctgtagacttga
Dmn1L	GTPasa similar a la dinamina 1	D: gctgggtccacgtttcacc R: cccattcttctgcttcaac
FABP4	Proteína transportadora de ácidos grasos 4	D: aatgtgcgacgcctttgt R: tgatgatcaagttgggcttg
FAS	Ácido graso sintasa	D: ggccacctcagtcctgttat R: aggggtccagtagagggtaca
GPX3	Glutación peroxidasa	D: gacacatccgggctcactat R: tggagacttaggagggtcctt
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible	D: accatggagcatccaagt R: accatggagcatccaagt
Receptor de insulina	Receptor de insulina	D: cagaaaaacctcttcaggcaat R: ttcaagggtatcttcgctttc
Lcad	Acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga	D: gcagttacttggaagagcaa R: ggcatgacaatatctgaatgga
Leptina	Leptina	D: ccaggatcaatgacatttcaca R: aatgaagtcaaaccggtga

**Tabla 11 (cont).** Secuencias de los cebadores utilizados para evaluar la expresión génica en muestras de tejido adiposo epididimal, tejido adiposo interescapular y tejido muscular.

Gen	Nombre completo	Secuencia en sentido 5'→3'
Receptor de leptina	Receptor de leptina	D: tgtcagaaattctatgtggtttgt R: ttggataggccaggtaagtg
Mcad	Acil-CoA deshidrogenasa de cadena media	D: cttagcttctgccctgtggt R: tgagagacacttctcaggacctt
Mfn2	Mitofusina 2	D: tcctgggcccctaagaatagc R: gagaggacgctgaacctgat
Nrf1	Factor de respiración nuclear 1	D: atagtctgtctggtggaaacc R: tccatgcatgaactccatct
OPA1	Proteína de atrofia óptica 1	D: ggatttcttactgctgggta R: cggatccatgatctgttgc
Pdk4	Piruvato deshidrogenasa kinasa 4	D: gagctgttctccgctacag R: agttctctcacaggcattttctg
PGC1 $\alpha$	Coactivador 1 $\alpha$ de PPAR $\gamma$	D: aaaggccaagcagagaga R: gtaaatcacacggcgtctt
PGC1 $\beta$	Coactivador 1 $\beta$ de PPAR $\gamma$	D: ttgacagtggagctttgtgg R: gggcttatatggaggtgtgg
PPAR $\alpha$	Receptor activado por proliferadores de peroxisomas	D: tgcggactaccagtacttaggg R: gctggagagagggtgtctgt
PRDm16	Dominio PR 16. Mitocondrial	D: cggatgttcccaacaaat R: acgctcttctgtgtggacaa
Resistina	Resistina	D: atcaagacttcagctccctactg R: gtgacggttgtgccttctg
SREBP1c	Proteína de unión al elemento regulador de colesterol 1c	D: acaagattgtggagctcaagg R: tgcgaagacagcagattta
Tfam	Factor de transcripción A. Mitocondrial	D: agctaaacaccagatgcaaa R: tcagctttaaataccgcttca
Tfb2m	Factor de transcripción 2B. Mitocondrial	D: caaaacccatcccatcaact R: tcagctttaaataccgcttca
UCP1	Termogenina	D: gcctgcctagcagacatcat R: tggccttcaccttgatct

### 3.2.3. Cuantificación del contenido de mitocondrias en tejido adiposo interescapular

Para cuantificar el contenido de mitocondrias del tejido adiposo interescapular, se comparó, mediante qPCR, el contenido de ADN mitocondrial (ADNm) y el contenido de ADN genómico (ADNg) en cada una de las muestras. Para ello, el ADN total se extrajo de las muestras utilizando el reactivo DNAzol (DNAzol Genomic DNA isolation reagent, MRC, Estados Unidos), siguiendo las indicaciones del fabricante. Las muestras



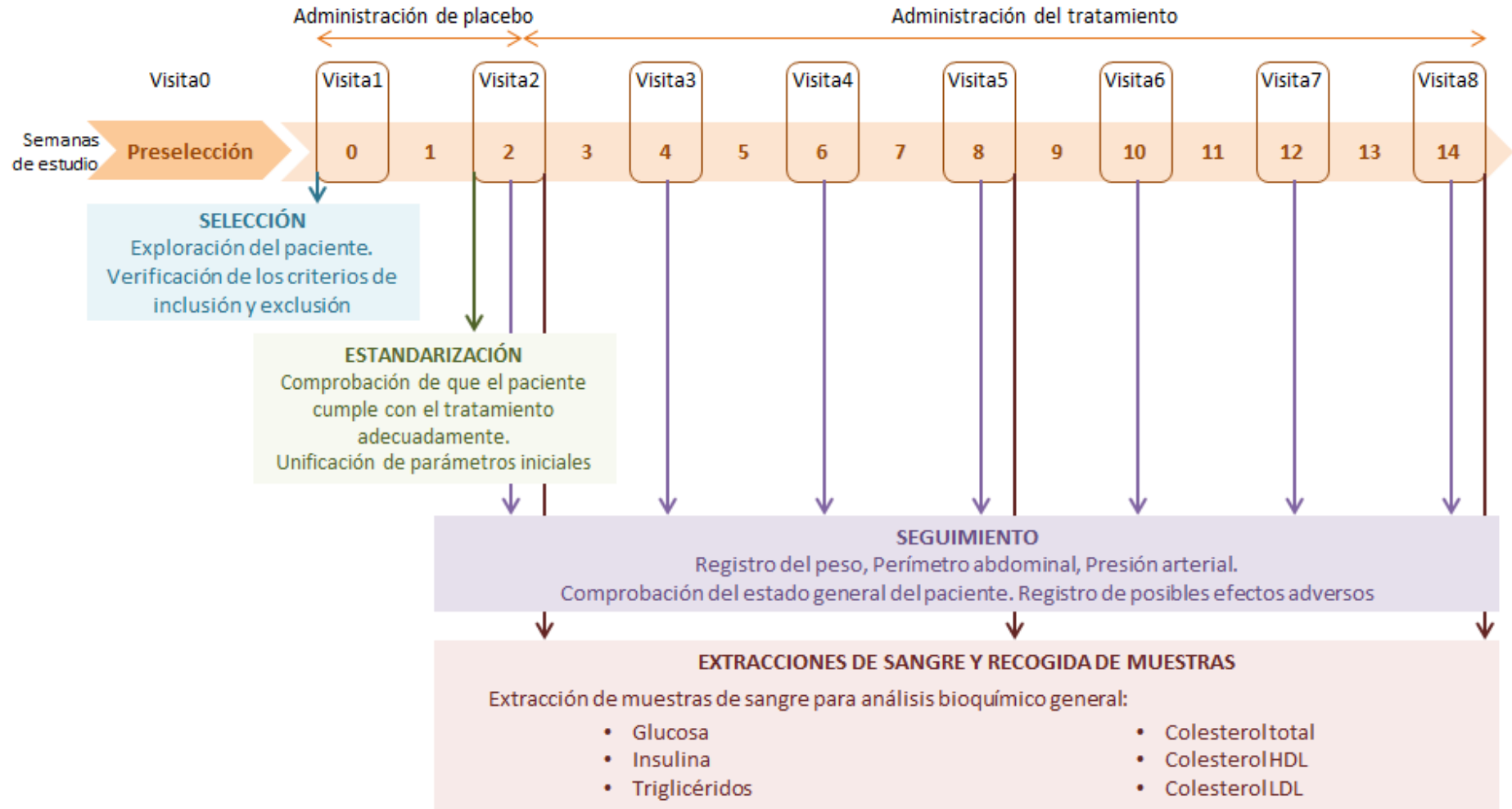
se homogeneizaron utilizando un lisador de tejidos (MM300, Retsch, Alemania). El ADN total extraído se cuantificó con un BioDrop (BioDrop  $\mu$ Lite, Biodrop, Estados Unidos).

Para cuantificar el contenido de ADNm en las muestras mediante qPCR se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.2.2. Se amplificó el gen mitocondrial Cox1 y posteriormente se realizó la amplificación del gen nuclear Cic1A, el cual se utilizó como gen de referencia (Livak y Schmittgen, 2001). Los cebadores utilizados para realizar las amplificaciones mencionadas se encuentran también incluidos en la Tabla 11. Todas las reacciones de amplificación se llevaron a cabo por duplicado.

### **3.3. Protocolo del estudio de intervención en humanos**

El estudio de intervención en humanos realizado en esta Tesis Doctoral, fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) de la Inspección General de Sanidad de la Defensa, con el código 08/11, de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki de 1975, enmendada en 2013, y el Real Decreto 1090/2015. El estudio se llevó a cabo en el Hospital Central de la Defensa Gómez Ulla (Madrid), bajo la dirección del Dr. Miguel Francisco Puerro. Todos los participantes fueron informados, previo al comienzo del estudio, mediante una hoja de información y un consentimiento informado.

El estudio de intervención en humanos realizado en esta Tesis Doctoral tuvo como objetivo evaluar la eficacia y seguridad del hidrolizado de clara de huevo en pacientes diagnosticados de síndrome metabólico. Para ello, se diseñó un estudio de intervención de 14 semanas de duración, doble ciego, aleatorio y controlado por placebo (Figura 19). A continuación se detalla el diseño del estudio de intervención en humanos, dividido en dos fases: la fase de selección de pacientes y la fase de intervención.



**Figura 19.** Diseño del estudio de intervención en humanos realizado en esta Tesis Doctoral.

### **3.3.1. Selección de pacientes**

El reclutamiento de potenciales pacientes para participar en el estudio de intervención se realizó en aquellos centros de atención primaria que tienen el Hospital Gómez Ulla como centro de referencia. En esta fase de reclutamiento, identificada como “visita 0”, los médicos de familia se encargaron de seleccionar posibles participantes que cumplieran los criterios de inclusión detallados a continuación. A los individuos interesados en participar, se les proporcionaba la hoja de información al paciente, con el fin de informar de forma exhaustiva del objetivo del estudio, y para resolver todas las dudas que tuvieran, antes de ser remitidos al Hospital Gómez Ulla.

Los pacientes que fueron derivados al Hospital Gómez Ulla, tuvieron allí una segunda visita de selección, denominada “visita 1”. En esta visita el Dr. Puerro verificaba que los pacientes reclutados en la visita 0 mantenían los criterios de inclusión del estudio. Además, en esta visita los pacientes que eran finalmente incluidos en el estudio firmaban también el consentimiento informado.

Para poder participar en este estudio de intervención en humanos, todos los pacientes seleccionados debían cumplir los siguientes criterios de inclusión:

- a) Hombres o mujeres con edades comprendidas entre 18 y 75 años.
- b) Participantes diagnosticados de síndrome metabólico según los criterios establecidos en la Tabla 12.

Además, en esta visita 1 se dividió a los pacientes en dos grupos, el grupo placebo y el grupo de tratamiento con hidrolizado, de forma aleatoria por un miembro externo al Hospital, para seguir manteniendo el doble ciego. La distribución de los pacientes en el grupo placebo y el grupo de tratamiento con hidrolizado se llevó a cabo en proporción 3:1.

**Tabla 12.** Criterios de diagnóstico de síndrome metabólico utilizados en el estudio de intervención en humanos realizado en la presente Tesis Doctoral y que han sido utilizados como criterios de inclusión.

<b>Para diagnosticarse el síndrome metabólico y aceptar la inclusión de un paciente al estudio de intervención en humanos, éste debe presentar:</b>		
Obesidad abdominal	Hombres	> 102 cm
	Mujeres	> 88 cm
<b>Además de dos factores de entre los indicados a continuación:</b>		
Índice de Masa Corporal		> 25
Triglicéridos		> 200 mg/dL
Glucemia en ayunas		> 100 mg/dL
Colesterol HDL	Hombres	< 40 mg/dL
	Mujeres	< 50 mg/dL
Presión arterial	Sistólica	≥ 140 mmHg
	Diastólica	≥ 95 mmHg

A continuación, en la visita 1, se proporcionaba a cada paciente incluido en el estudio 30 sobres monodosis de 0.5 g (tratamiento suficiente para 15 días), con placebo (maltodextrina), indicándoles que tomaran dos sobres diarios (un sobre con el desayuno y otro con la cena). Además, se les recomendó que a partir de este momento no variasen de forma drástica su estilo de vida y su dieta habitual. La siguiente visita (visita 2) se acordó a las dos semanas de la visita 1. A esta fase inicial de estandarización con placebo se le denominó “periodo de estandarización”. Esta fase del estudio tuvo como finalidad analizar la capacidad de los pacientes para cumplir las indicaciones proporcionadas y el correcto cumplimiento del tratamiento, previo a la administración de los tratamientos de estudio.

#### 3.3.1.1. Criterios de exclusión

Los pacientes que cumplían los criterios de inclusión, pero que presentaron alguno de los criterios de exclusión que se muestran a continuación, no pudieron ser incluidos en el estudio:

- a) Historia clínica de alergia o intolerancia al huevo o sus derivados.

- b) Hipertensión arterial secundaria.
- c) Tratamiento hipotensor iniciado menos de 30 días antes de la visita 0.
- d) Tratamiento hipotensor basado en cualquier otro grupo farmacológico diferente a  $\beta$  bloqueantes o diuréticos.
- e) Pacientes que modifiquen su tratamiento hipotensor o hipolipemiente durante el estudio de intervención.
- f) Pacientes que hayan padecido un accidente cerebrovascular o un infarto agudo de miocardio en los 6 meses previos al estudio.
- g) Patología cardíaca clínicamente significativa: Insuficiencia cardíaca congestiva, shock cardiogénico, arritmia no controlada, miocarditis o pericarditis aguda, cardiopatía congénita o valvular significativa, angina de pecho inestable o bloqueo aurículo-ventricular de segundo o tercer grado.
- h) Diabetes mellitus diagnosticada, aunque esté controlada únicamente con dieta.
- i) Disfunción renal clínicamente significativa.
- j) Enfermedad hepática significativa.
- k) Enfermedad gastrointestinal significativa que pueda interferir con la completa absorción de la medicación del estudio (ej. Enfermedad inflamatoria intestinal).
- l) Infección severa, neoplasia (deben haber estado libre de enfermedad al menos los últimos 5 años), psicosis o historia psiquiátrica.
- m) Pacientes que difícilmente cumplan con el tratamiento, es decir, que hayan cumplido menos del 85% de las tomas durante el periodo de estandarización con placebo.
- n) Pacientes con sospecha de abuso de alcohol o drogas.
- o) Pacientes que hayan participado en algún otro estudio clínico en los 30 días previos.
- p) Utilización de cualquier otro fármaco que, a juicio del investigador, pudiera tener repercusión sobre la presión arterial.
- q) Mujeres embarazadas o lactantes.
- r) Pacientes con presión arterial sistólica  $\geq 180$  mmHg y/o presión arterial diastólica  $\geq 110$  mmHg.

### 3.3.2. Fase de intervención

En la visita 2, dos semanas después desde la visita 1, se verificó el cumplimiento de las indicaciones por parte de los pacientes. En esta visita se realizaron además extracciones de sangre a todos los pacientes con el fin de realizar una analítica general para establecer los valores bioquímicos iniciales de cada paciente, además de analizar el estado general de salud de los pacientes, previos al inicio de tratamiento. Aquellos pacientes que no cumplieron los criterios recogidos en la Tabla 12 en este momento tuvieron que ser eliminados del estudio. Los protocolos llevados a cabo para el análisis de estas muestras se detallan en el apartado 3.3.3.

A continuación se detalla la composición de los tratamientos que recibió cada grupo de intervención del estudio.

El estudio de intervención realizado en esta Tesis Doctoral dividió a los pacientes en dos grupos de tratamiento. Un grupo de tratamiento con placebo y un grupo de tratamiento con hidrolizado de clara de huevo con pepsina.

El placebo seleccionado para este estudio fue maltodextrina, administrada en forma liofilizada en sobres monodosis de 0.5 g durante las primeras 2 semanas (hasta la visita 2) del estudio a todos los pacientes, y durante la totalidad del estudio en sobres monodosis de 2 g, a aquellos pacientes asignados al grupo de tratamiento con placebo, o grupo control.

El tratamiento con el hidrolizado de clara de huevo con pepsina se elaboró siguiendo el protocolo detallado en el apartado 3.1 y se administró a los pacientes, liofilizado en sobres monodosis de 2 g.

En cada visita de seguimiento, se entregó a los pacientes un paquete cerrado que contenía un total de 30 sobres monodosis codificados y se les indicó que debían tomar una dosis de 4 g al día, dividida en dos tomas, desayuno y cena, disuelto en agua u otro producto líquido como zumo de fruta, leche, infusiones, yogur, etc. La dosificación elegida para llevar a cabo este estudio de intervención en humanos se seleccionó en base a las dosis utilizadas previamente en ensayos en animales (Garcés Rimón, 2014; Garcés-Rimón *et al.*, 2016a; Garcés-Rimón *et al.*, 2018; Moreno-

Fernández *et al.*, 2018), y siguiendo las indicaciones de Reagan-Shaw *et al.* (2007) para extrapolar la dosis correspondiente a los humanos.

Cada tratamiento se encontraba codificado para que, ni el paciente, ni el profesional sanitario, supiesen el grupo asignado, con una numeración que indicaba, en documento a parte, si el tratamiento consistía en producto activo (hidrolizado de clara de huevo con pepsina) o placebo (maltodextrina).

Una vez distribuidos los tratamientos a cada grupo de pacientes, se acordaron citas en el Hospital Gómez Ulla cada 15 días, hasta un total de seis visitas de seguimiento (de la visita 3 a la visita 8).

En las seis visitas de seguimiento (3, 4, 5, 6, 7 y 8) se realizó una valoración antropométrica, donde se registró el peso corporal y el perímetro abdominal de cada uno de los pacientes, así como los niveles de presión arterial. Se valoró también la posible aparición de algún efecto secundario, y se facilitó a cada uno de los participantes, suficiente tratamiento hasta la siguiente visita.

En las visitas 5 y 8 del estudio (estado intermedio y estado final), se recogieron además muestras de sangre que se procesaron siguiendo los protocolos descritos en el apartado 3.3.3.

### **3.3.3. Recogida de muestras y determinaciones realizadas a lo largo del estudio**

En las visitas 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 del estudio se midió el perímetro abdominal y la presión arterial de los participantes:

#### **3.3.3.1. Medida del perímetro abdominal**

El perímetro abdominal de los participantes del estudio de intervención se midió siguiendo las indicaciones de la OMS (World Health Organization, 2008). El paciente se colocó de pie, con los pies lo más juntos posible, en posición relajada. Para tomar la medida se colocó una cinta métrica justo sobre el ombligo, rodeando la

cintura del participante sobre las crestas iliacas. Los resultados de las mediciones del perímetro abdominal se expresaron en cm.

### *3.3.3.2. Medida de la presión arterial*

La medida de la presión arterial de los participantes del estudio de intervención se realizó siguiendo las recomendaciones establecidas por el CPMP/EWP/238/95 (Rev. 3) del 22 de enero de 2009 (CHMP, 2009). Se utilizó como instrumento de medida un esfigmomanómetro de mercurio. Se tomó como valor de presión arterial la media de un mínimo de 3 mediciones separadas entre sí un mínimo de 2 minutos, con el paciente sentado y en reposo durante al menos 30 minutos antes de la primera medición. Los resultados de PAS y de presión arterial diastólica PAD se expresaron en mmHg.

### *3.3.3.3. Extracción de sangre y determinaciones bioquímicas*

Se extrajeron muestras de sangre de los pacientes en la visita 2 (semana 2 del estudio; tiempo inicial), en la visita 5 (semana 8 del estudio; tiempo intermedio) y 8 (semana 14 del estudio; tiempo final).

Las muestras de sangre se recogieron en un tubo sin anticoagulante a partir del que se obtuvo suero mediante centrifugación de la muestra. Las muestras refrigeradas se trasladaron inmediatamente a un laboratorio de análisis externo (UNILABS, Madrid) donde se realizó un análisis bioquímico general. Concretamente se determinaron concentraciones de glucosa, insulina, TG, colesterol total, colesterol HDL y colesterol LDL.

Los resultados de concentración de glucosa, TG, colesterol total, colesterol HDL y colesterol LDL se expresaron en mg/dL de suero. Los resultados de concentración de insulina se expresaron en ng de insulina/ml de suero.



### **3.3.4. Criterios de retirada**

Los pacientes que durante cualquier etapa del estudio de intervención presentaron alguna de las siguientes circunstancias, fueron retirados inmediatamente del proceso:

- a) Presentar algún efecto adverso considerado como grave.
- b) Cumplir cualquiera de los requisitos contemplados en los criterios de exclusión.
- c) Presentar una situación clínica modificada por otras patologías sobrevenidas en el transcurso del estudio y que, a juicio de los investigadores, interfirieran con su permanencia como sujeto de estudio.

### **3.4. Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos en los estudios con animales se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM), para un mínimo de, al menos, 6 animales.

Para el análisis estadístico de los resultados no pareados se utilizó el test “t de student” para aquellos datos de carácter paramétrico. En el caso de los resultados de carácter no paramétrico se utilizó el test “U de Mann-Whitney”.

El análisis de los resultados pareados se realizó mediante el cálculo de la varianza utilizando un test ANOVA de una o dos vías, seguido del test de Bonferroni.

Se consideró siempre significativa la diferencia para valores de  $P < 0.05$ . Para realizar el análisis estadístico de las muestras se utilizó el programa GraphPad Prism versión 6.0 para Windows (Graph-Pad Software, Estados Unidos).

En los resultados obtenidos del estudio de intervención en humanos se representaron los valores obtenidos de cada parámetro evaluado mediante gráficas de dispersión en que se representó la evolución individual de cada uno de los participantes en el estudio. Debido a tamaño muestral reducido, no se realizó análisis estadístico de estos resultados.

# 4

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente apartado se muestran los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral y la discusión de los mismos. Para ello, se ha dividido la sección en tres apartados o capítulos. En el primero de ellos, se exponen los resultados obtenidos en los experimentos llevados a cabo para seleccionar el modelo experimental de DIO más apropiado en el que evaluar los efectos de determinados componentes de los alimentos sobre el síndrome metabólico y sus complicaciones. A continuación, en el segundo apartado se explican y discuten los resultados obtenidos en el estudio que se realizó para evaluar el efecto de la administración del hidrolizado de clara de huevo con pepsina sobre el modelo animal de DIO seleccionado. En este apartado se discuten también los resultados de los experimentos que se llevaron a cabo para investigar el posible mecanismo de acción implicado en el efecto producido por el hidrolizado de clara de huevo en el modelo experimental de DIO. Por último, se presentan los resultados obtenidos en el estudio de intervención en humanos realizado para evaluar la eficacia y seguridad del hidrolizado de clara de huevo en pacientes con síndrome metabólico.

#### **4.1. Selección del modelo experimental de obesidad inducida por dieta**

A lo largo de los años se ha demostrado que no todos los pacientes en los que procede diagnosticar síndrome metabólico presentan idénticas alteraciones. De hecho, para su diagnóstico se requiere la confluencia de varios factores de riesgo, que pueden variar según se utilice una u otra definición de las que se recogen en la literatura actual, y todavía no existe consenso sobre una definición concreta para el diagnóstico del síndrome metabólico. Por este motivo, no existe tampoco un único modelo animal en el que evaluar productos que podrían resultar útiles en el tratamiento del síndrome metabólico. De entre los múltiples modelos existentes, los modelos experimentales de DIO son los más utilizados para investigar la etiología del síndrome metabólico que se desarrolla en el ser humano, y también para investigar sus posibles tratamientos, debido a que estos modelos son los que mejor representan los hábitos de alimentación de la sociedad actual.

Los modelos animales de DIO tienen como objetivo reproducir los hábitos alimentarios de los pacientes que desarrollan síndrome metabólico. Es por ello que

estos modelos se basan en la administración, durante periodos prolongados, de dietas hipercalóricas con un alto contenido de grasas y azúcares.

En los últimos años, se ha relacionado el aumento del consumo de fructosa con el aumento en la incidencia de obesidad y/o síndrome metabólico en la sociedad actual. Es por este motivo que hasta la fecha, la mayor parte de los modelos desarrollados han utilizado fructosa o sacarosa como azúcar principal para inducir el desarrollo de obesidad y/o síndrome metabólico en los animales de experimentación. Sin embargo, podría estar pasando desapercibido el alto consumo de glucosa que se está produciendo en la sociedad actual, sobre todo en comunidades europeas, no habiéndose estudiado hasta la fecha la influencia de este azúcar sobre el desarrollo de las alteraciones asociadas al síndrome metabólico.

Por todo ello, la primera etapa de esta Tesis Doctoral tuvo como objetivo principal llevar a cabo un estudio experimental con el propósito de seleccionar el modelo de DIO más adecuado, es decir, un modelo en el que se desarrollen la mayor parte de las alteraciones o complicaciones asociadas al síndrome metabólico humano. En este primer estudio se compararon las alteraciones cardiometabólicas desarrolladas en varios modelos experimentales tras el consumo prolongado de una dieta con alto contenido en grasa, o dietas con alto contenido en grasa en combinación con la administración de dos tipos de azúcares muy consumidos en la sociedad actual: fructosa o glucosa. Para ello, en este estudio se establecieron un total de cuatro grupos experimentales a los que se les administró, respectivamente, durante todo el estudio: una dieta sólida estándar y agua como bebida (C), una dieta hipergrasa y agua como bebida (DG), una dieta hipergrasa y una solución acuosa de fructosa al 25% como bebida (DGf) y una dieta hipergrasa con una solución acuosa de glucosa al 25% como bebida (DGg). Según las dietas administrada a cada uno de los grupos experimentales, entre un 28 y un 46% de la energía total procede de las grasas y un 28% de la energía total procede de los azúcares libres (fructosa o glucosa, respectivamente en los grupos experimentales en los que se administran). Estos porcentajes superan claramente los valores de referencia publicados por la OMS en 2015, en los que se establece que en una dieta equilibrada la energía procedente de las grasas no debe superar el 30% (World Health Organization, 2015; Rippe y

Angelopoulos, 2016b). También se limita el consumo de azúcares simples a un máximo del 10%. En diversos estudios poblacionales, el consumo diario en la dieta de entre un 23 y un 35% de grasas y entre un 15 y un 20% de azúcares simples se ha relacionado también con el desarrollo de sobrepeso, obesidad y con el desarrollo de alteraciones cardiometabólicas asociadas a estas patologías (Malik *et al.*, 2006; Kwon *et al.*, 2018; Slagter *et al.*, 2018).

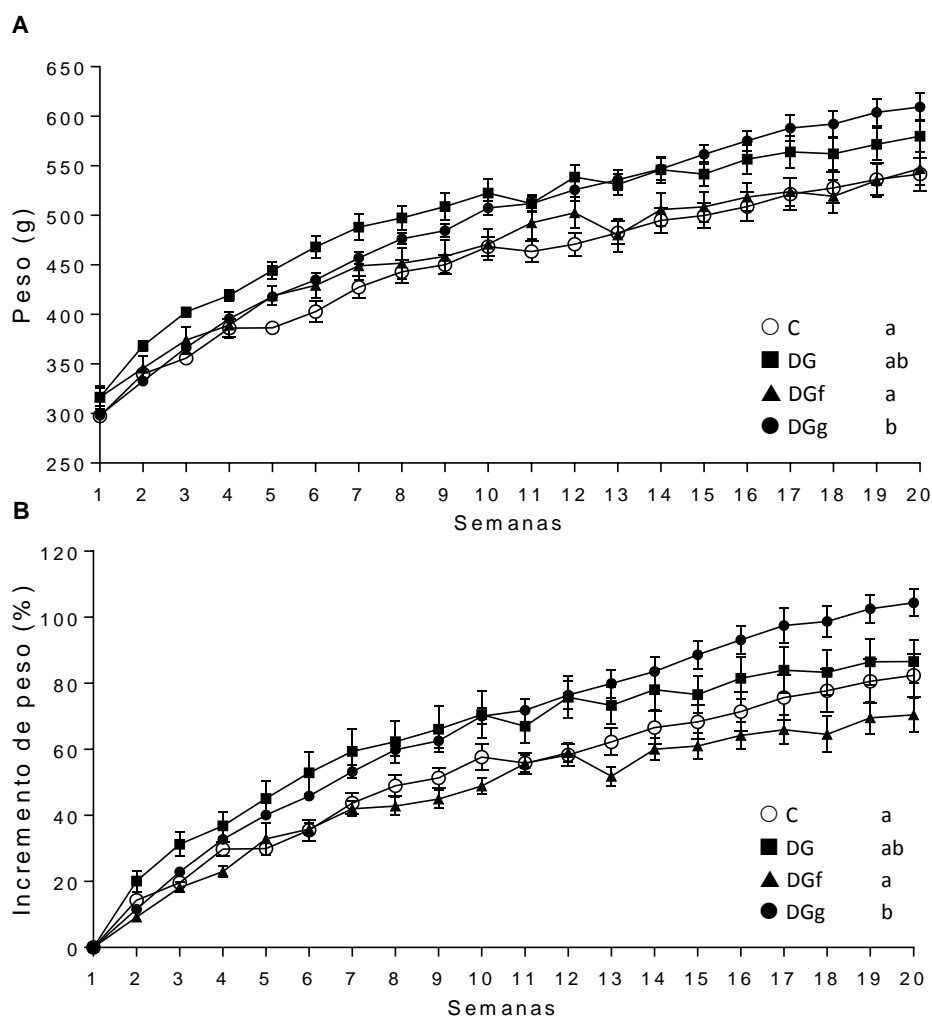
En la Tabla 13 se muestran los resultados de las ingestas (sólida, líquida y calórica) obtenidas en los diferentes grupos experimentales. Se observa que los tres grupos de DIO presentaron una ingesta sólida menor en comparación con el grupo control. Además, los grupos DGf y DGg presentaron una ingesta sólida significativamente menor que el grupo DG. Por otra parte, los grupos DG y DGf redujeron significativamente sus ingestas líquidas cuando se compararon estos valores con los del grupo control. Sin embargo, el grupo DGg no mostró modificaciones en este parámetro. En conjunto, la ingesta calórica de todos los grupos de DIO fue significativamente mayor en comparación con el grupo control. La ingesta calórica del grupo DGg fue además significativamente mayor que la del resto de grupos experimentales. Algunos investigadores atribuyen a la fructosa una mayor capacidad para provocar ganancia de peso corporal debido a que éste azúcar tiene menos efecto saciante en comparación con otros azúcares (Martins Pereira *et al.*, 2017). De este modo, la ingesta de fructosa podría suponer una mayor ingesta calórica en los animales de experimentación, produciéndose así una mayor ganancia de peso, algo que, sin embargo, no se observó en nuestro estudio. También existe la posibilidad de que las diferencias en las ingestas líquidas y calóricas observadas entre los diferentes grupos se deban al desarrollo de saciedad sensorial específica. Este tipo de saciedad se define como una reducción progresiva del placer que se siente al ingerir un alimento específico cuando este se ingiere de manera continuada (Myers, 2017). Es importante tener en cuenta que la fructosa tiene el doble de poder endulzante que la glucosa, pudiendo también tener una mayor capacidad de inducir saciedad sensorial (Hull, 2010). Es posible que cuando se administra de forma continuada la solución de glucosa sea más agradable de ingerir que la solución de fructosa, hecho que también se ha descrito recientemente por otros investigadores (De Stefanis *et al.*, 2017). Esta mejora

sensorial permitiría que, bajo condiciones de consumo *ad libitum*, se consiga una mayor ingesta calórica en el grupo que consume la solución de glucosa, como se ha observado en esta Tesis Doctoral. Esta característica sensorial, que es específica de la glucosa, podría además posibilitar que los animales acumulen adiposidad y desarrollen alteraciones metabólicas en un periodo de tiempo más reducido. Estos resultados sugieren que es mejor utilizar una dieta combinada con alto contenido de grasas y azúcares, y priorizar un elevado contenido de glucosa en la dieta, para conseguir establecer un modelo de DIO más apropiado.

**Tabla 13.** Ingestas diarias de los animales de experimentación durante el estudio. Grupos experimentales: Grupo control (C), grupo de dieta grasa (DG), grupo de dieta grasa con fructosa (DGf) y grupo de dieta grasa con glucosa (DGg). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó el test t de Student para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores  $P < 0.05$ . Las letras diferentes representan la existencia de diferencias significativas entre grupos.

Parámetro (n $\geq$ 6)	Grupo experimental			
	C	DG	DGf	DGg
Ingesta sólida media (g/día)	24.47 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	20.36 $\pm$ 0.61 <sup>b</sup>	15.10 $\pm$ 0.40 <sup>c</sup>	14.98 $\pm$ 0.44 <sup>c</sup>
Ingesta líquida media (mL/día)	43.31 $\pm$ 1.31 <sup>a</sup>	25.84 $\pm$ 0.82 <sup>c</sup>	32.97 $\pm$ 1.42 <sup>b</sup>	42.97 $\pm$ 1.39 <sup>a</sup>
Ingesta calórica media (kcal/día)	71.25 $\pm$ 1.07 <sup>a</sup>	89.54 $\pm$ 2.69 <sup>b</sup>	98.88 $\pm$ 2.18 <sup>c</sup>	105.65 $\pm$ 2.02 <sup>d</sup>

En la Figura 20 se representa la evolución del peso corporal de los distintos grupos de animales a lo largo del periodo experimental. Se observa que los animales del grupo DGg aumentaron significativamente sus valores de peso corporal respecto a los animales del grupo C, mientras que los animales de los grupos DG y DGf no mostraron diferencias significativas en este parámetro en comparación con el grupo C (Figura 20A). Si analizamos los resultados respecto a la ganancia de peso corporal, el grupo DGg fue el único grupo experimental de DIO que mostró diferencias significativas con respecto al grupo C desde el inicio del estudio y hasta finalizar el periodo experimental (Figura 20B). Estas diferencias empezaron a observarse, concretamente, desde la semana 5 del estudio. Por otra parte, el grupo DGf fue el que menos ganancia de peso experimentó a lo largo de todo el estudio respecto a su peso inicial.



**Figura 20.** Evolución del peso corporal de los animales durante el estudio, representado como (A) peso neto de los animales, (B) ganancia de peso corporal con respecto a la semana 1 del estudio. Grupos experimentales: Grupo control (C, ○), grupo de dieta grasa (DG, ■), grupo de dieta grasa con fructosa (DGf, ▲), grupo de dieta grasa con glucosa (DGg, ●). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) seguido del test de Bonferroni para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores  $P < 0.05$ . Las letras diferentes representan la existencia de diferencias significativas entre grupos.

El aumento de peso corporal se produce por un desequilibrio entre la energía consumida a través de los alimentos y la energía gastada (Seo *et al.*, 2017). Considerando las ingestas calóricas (calculadas a partir de las ingestas líquida y sólida) observadas en los diferentes grupos experimentales, se esperaría que todos los grupos que consumieron dieta grasa experimentaran un aumento de peso corporal. Este

aumento de peso debería ser, además, directamente proporcional al aumento observado en su ingesta calórica (Tabla 13). Sin embargo, el grupo que consumió dieta grasa y fructosa finalizó el estudio con un peso corporal semejante al del grupo control. Este resultado podría indicar que el consumo de esta dieta pudiera estar induciendo alguna ruta metabólica que aumente el gasto energético. Es importante destacar que el grupo DGg fue el único que mostró diferencias significativas en el peso corporal con respecto al grupo control, y fue este grupo además el grupo que mayor peso corporal alcanzó al finalizar el periodo experimental.

La literatura actual recoge una gran variedad de escalas que permiten medir de forma objetiva el grado de obesidad de un paciente. El IMC y el perímetro abdominal han sido hasta la fecha los parámetros más utilizados para predecir el desarrollo de patologías asociadas a la obesidad y al síndrome metabólico (Seo *et al.*, 2017). El perímetro abdominal se encuentra directamente relacionado con el depósito de tejido adiposo de tipo visceral, más activo en la producción de adipocitoquinas causantes de gran parte de las alteraciones asociadas a la condición de obesidad (Grundy, 2015). Por otro lado, aunque en los últimos años su uso para predecir el desarrollo de síndrome metabólico comienza a cuestionarse, el IMC sigue aun considerándose como un marcador de riesgo metabólico válido (Vasques *et al.*, 2015; Delvarianzadeh *et al.*, 2017; Seo *et al.*, 2017). En este estudio se llevó a cabo un registro del perímetro abdominal y se calculó el IMC de los animales al finalizar el periodo experimental, aprovechando la facilidad de manejo para tomar dichas medidas tras la aplicación de los fármacos anestésicos previas al proceso de eutanasia de los animales.



La

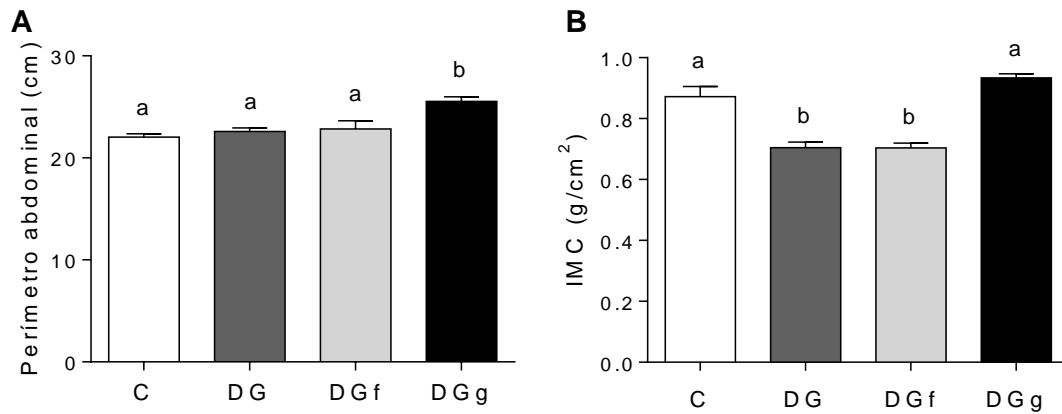


Figura 21 representa los valores de perímetro abdominal e IMC de los diferentes grupos experimentales al finalizar el estudio. Se observa que los animales de los grupos DG y DGf no modificaron su perímetro abdominal con respecto a los animales del grupo control, mientras que el perímetro abdominal de los animales del grupo DGg aumentó de forma significativa respecto al grupo control (

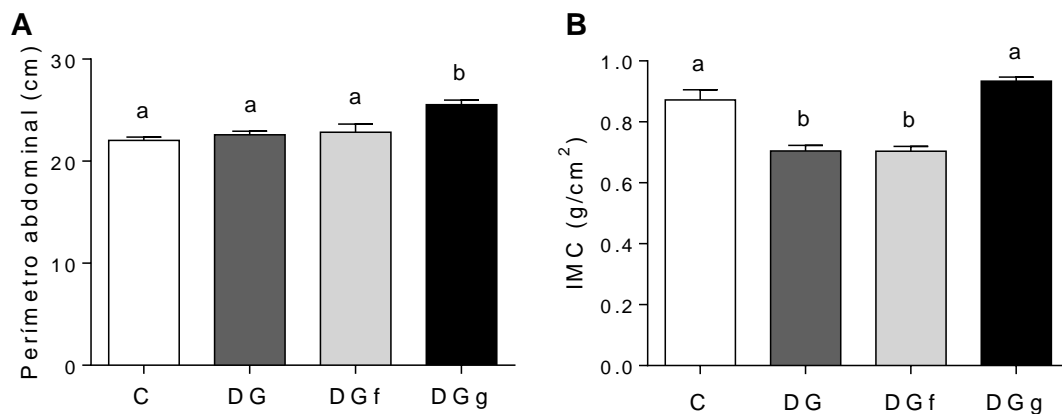


Figura 21A). Por otro lado, los grupos DG y DGf mostraron una reducción significativa de su IMC respecto al IMC observado en el grupo control (

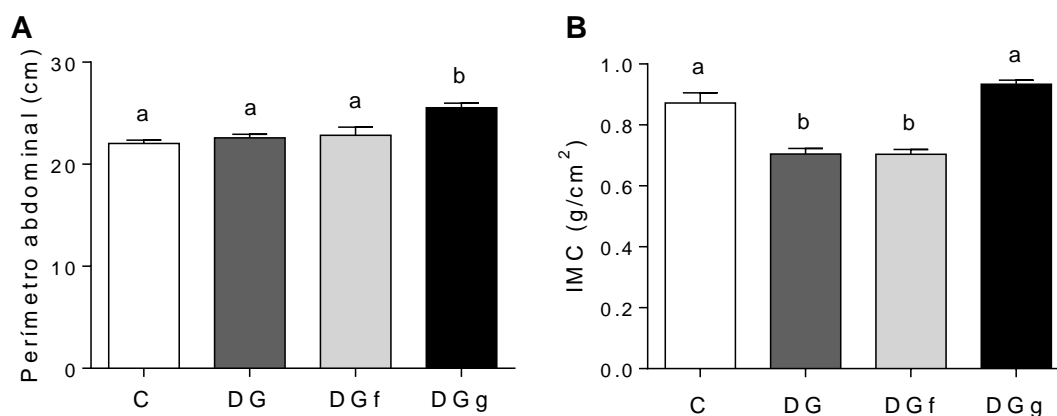
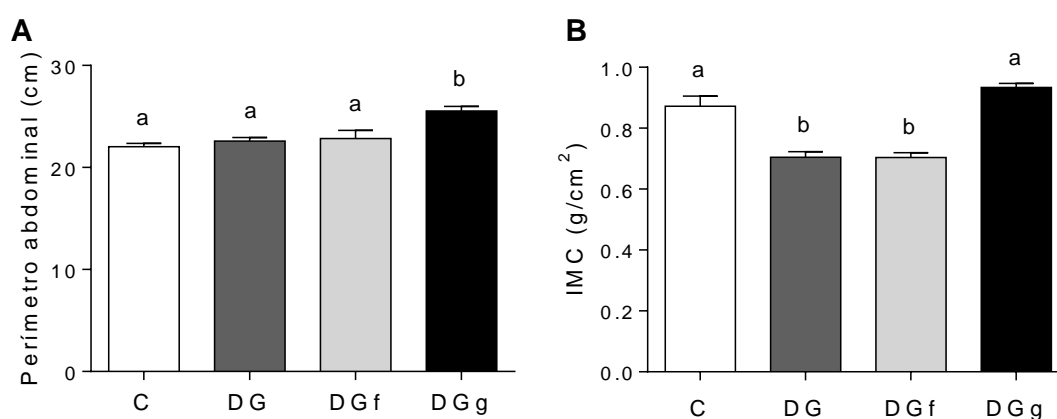


Figura 21B). En el grupo DGg no se observaron sin embargo diferencias en este índice respecto al grupo control. Si bien el resultado obtenido en el IMC podría no ser concluyente, al combinarse este resultado con los valores observados en el perímetro abdominal, los grupos DG y DGf muestran un menor riesgo de desarrollar alteraciones cardiometabólicas comunes en el síndrome metabólico. El grupo DGg, que sí mostró un aumento en su perímetro abdominal, y también experimentó un ligero aumento de su IMC, sugiere la existencia de un mayor riesgo de sufrir alteraciones cardiometabólicas relacionadas con el síndrome metabólico en este grupo de animales respecto al resto de grupos experimentales de DIO.



**Figura 21.** Resultados referentes a la composición corporal de los diferentes grupos experimentales. (A) Perímetro abdominal y (B) índice de masa corporal (IMC) de los diferentes grupos experimentales al finalizar el estudio. Grupos experimentales: Grupo control (C), grupo de dieta grasa (DG), grupo de dieta grasa con fructosa (DGf), grupo de dieta grasa con glucosa (DGg). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó el test t de Student para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores  $P < 0.05$ . Las letras diferentes representan la existencia de diferencias significativas entre grupos.

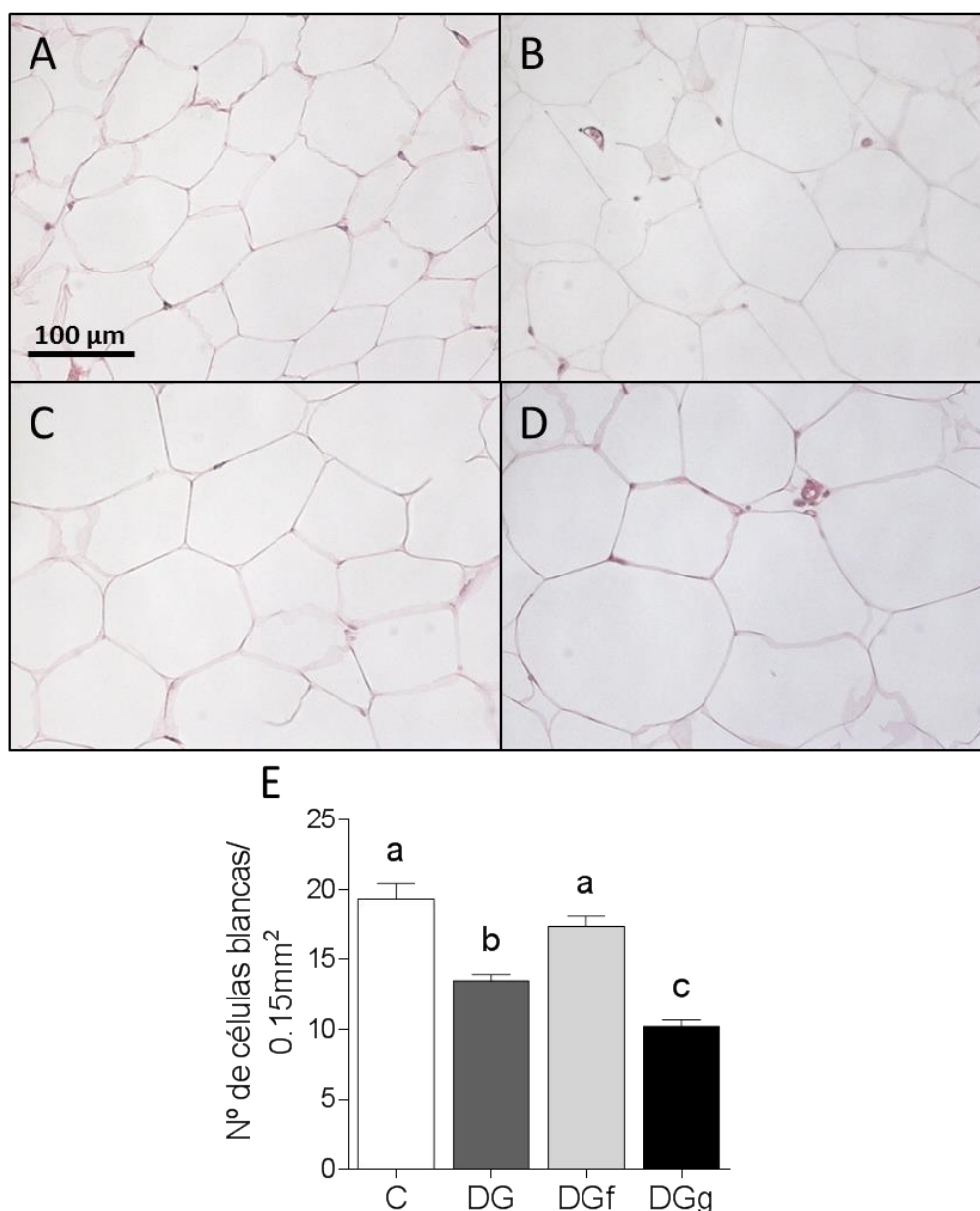
En la Tabla 14 se representan los pesos relativos del tejido adiposo epididimal y del hígado de los diferentes grupos experimentales al finalizar el estudio. Se observa un aumento significativo del peso relativo del tejido adiposo epididimal en los grupos DG y DGg cuando se compararon estos valores con los valores del grupo control. Cabe destacar que el grupo DGg prácticamente dobló este parámetro respecto al grupo control. No se observaron diferencias significativas en este parámetro al comparar el grupo DGf con los animales del grupo control. Por otra parte, aunque no se observaron diferencias significativas en el peso relativo del hígado, este parámetro aumentó ligeramente en los tres grupos de DIO. Este aumento fue más notable en los grupos DGf y DGg. Estos resultados se discuten más adelante junto con la histología de los mismos.

**Tabla 14.** Pesos relativos de los órganos en los diferentes grupos animales al finalizar el estudio. Grupos experimentales: Grupo control (C), grupo de dieta grasa (DG), grupo de dieta grasa con fructosa (DGf) y grupo de dieta grasa con glucosa (DGg). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó el test t de Student para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores  $P < 0.05$ . Las letras diferentes representan la existencia de diferencias significativas entre grupos.

Órgano (g/cm de tibia) (n $\geq$ 6)	Grupo			
	C	DG	DGf	DGg
Tejido adiposo epididimal	$3.70 \pm 0.24^a$	$4.94 \pm 0.27^{bc}$	$3.98 \pm 0.53^{ac}$	$6.28 \pm 0.52^b$
Hígado	$2.90 \pm 0.09^a$	$3.01 \pm 0.08^a$	$3.12 \pm 0.10^a$	$3.15 \pm 0.10^a$

En la Figura 22 se muestran las imágenes de tejido adiposo blanco tomadas en microscopio óptico, así como el recuento de adipocitos blancos por campo de observación en cada uno de los grupos de estudio. En los cortes histológicos se observa, de forma general, un aumento del tamaño de los adipocitos principalmente en los grupos DG y DGg al compararlos con los adipocitos del grupo control. Así, el número de adipocitos por campo de observación fue significativamente menor en los grupos DG y DGg respecto al grupo control (Figura 22E). Además, el grupo DGg presentó un número de adipocitos blancos significativamente menor que los grupos DG y DGf. El tejido adiposo epididimal se considera en roedores como un tejido adiposo visceral con elevada producción de adipocitoquinas (Ferrannini *et al.*, 2016). El

notable aumento del peso de este tejido en el grupo DGg observado en la Tabla 14, concuerda con el aumento observado en el perímetro abdominal, y esto sugiere que podría producirse una mayor producción de adipocitoquinas en el tejido adiposo de este grupo, que aceleraría el desarrollo de inflamación y alteraciones asociadas al síndrome metabólico. Además, los resultados histológicos muestran un desarrollo significativo de hipertrofia en los grupos DG y DGg, y esta hipertrofia no se observó en el grupo DGf. Se conoce bien que el desarrollo de hipertrofia en los adipocitos conduce, en última instancia, al desarrollo de hipoxia y apoptosis con la consecuente disfunción del tejido adiposo (Trayhurn *et al.*, 2008; Lafontan, 2014; Engin, 2017). Los resultados histológicos podrían indicar una mayor tendencia a la disfunción del tejido adiposo y, por tanto, una mayor disposición a desarrollar estrés oxidativo e inflamación en los grupos DG y DGg respecto al grupo DGf.

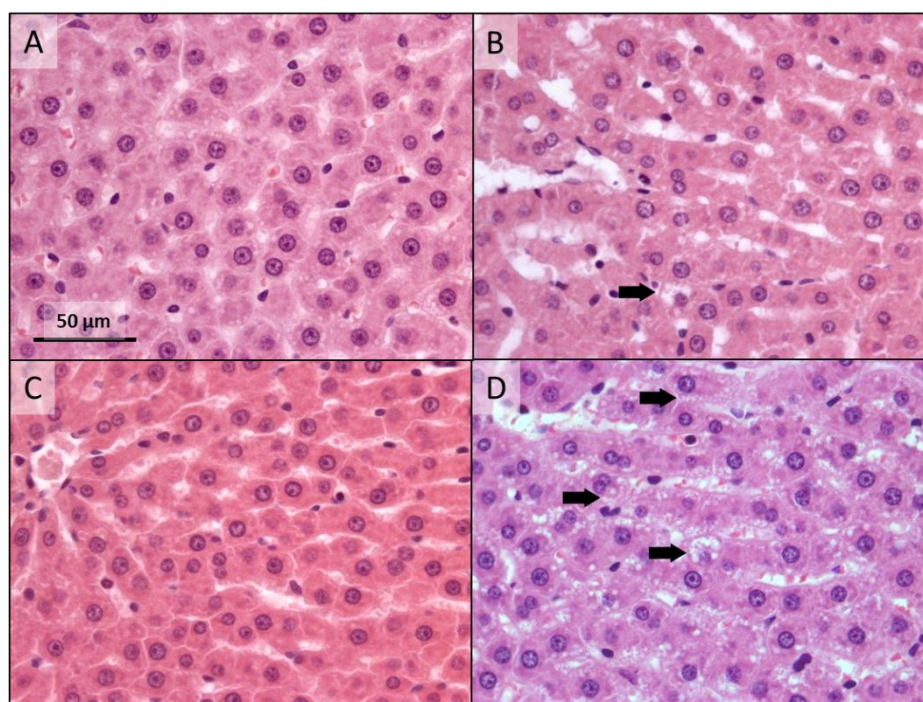


**Figura 22.** Valoración histológica de muestras de tejido adiposo epididimal. (A-D) Imágenes tomadas en el microscopio óptico de cortes de tejido adiposo epididimal (blanco) teñidos con hematoxilina-eosina; (E) Recuento del número de adipocitos en tejido adiposo epididimal por área de objetivo 20x de los diferentes grupos experimentales al finalizar el estudio. Grupos experimentales: (Imagen A) grupo control (C), (imagen B) grupo de dieta grasa (DG), (imagen C) grupo de dieta grasa con fructosa (DGf), y (imagen D) grupo de dieta grasa con glucosa (DGg). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó el test t de Student para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores  $P < 0.05$ . Las letras diferentes representan la existencia de diferencias significativas entre grupos.

Por otra parte, el hígado es el principal órgano encargado de la lipogénesis y, en este tejido, se metabolizan todos los ácidos grasos procedentes de la dieta antes de su liberación al torrente sanguíneo (Grundy, 2016). Por ello, el hígado se considera un

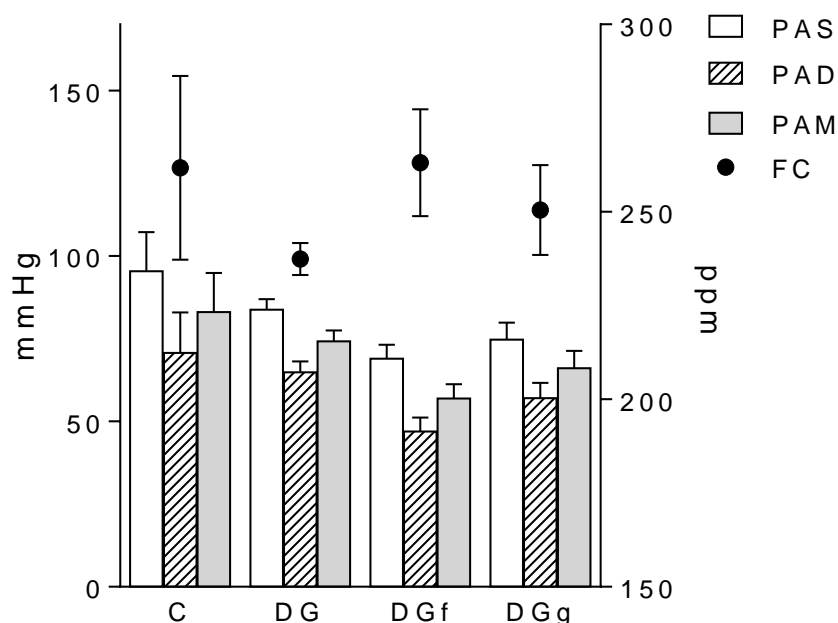
órgano muy susceptible a la acumulación ectópica de lípidos, que deriva, en última instancia, en el desarrollo de HGNA. En otros estudios se ha relacionado un aumento de los pesos absolutos y relativos del hígado con el desarrollo de esteatosis hepática (Kawasaki *et al.*, 2009; Garcés-Rimón *et al.*, 2016a). El leve aumento del peso relativo del hígado en los animales de los grupos DGf y DGg podría deberse a la acumulación de lípidos en este órgano. Es muy probable que, si aumentáramos el tiempo de duración del estudio y por lo tanto se administraran estas dietas durante más semanas, pudiera desarrollarse esteatosis hepática y/o HGNA. Por ello, consideramos necesario realizar un estudio histológico de este tejido. Los cortes histológicos del tejido hepático (Figura 23) mostraron la presencia de vesículas lipídicas principalmente en los grupos DG y DGg al compararlos con el grupo control. Los cortes histológicos de los hígados del grupo DGf no mostraron signos de esta alteración.

Varios estudios han demostrado que la administración de dietas con alto contenido en grasa y fructosa provoca un aumento del peso corporal, acumulación de grasa visceral y un incremento en el IMC (Panchal y Brown, 2011; Panchal *et al.*, 2011; Aydin *et al.*, 2014). Sin embargo, los resultados de nuestro estudio no se corresponden con estas afirmaciones. Es importante tener en cuenta que en los estudios de los otros investigadores, las dietas administradas a los animales se componen de fructosa en un elevado porcentaje (40-70% del contenido energético total) (Panchal *et al.*, 2011; Aydin *et al.*, 2014). Es posible por tanto, que para provocar una acumulación lipídica y un aumento de peso como el observado en los anteriores estudios sea necesario administrar un contenido de fructosa mucho mayor del que nosotros hemos administrado en nuestro estudio a los animales. Sin embargo, un porcentaje tan alto del contenido energético de las dietas administradas en forma de fructosa podría no representar de forma realista el consumo de azúcares de la sociedad actual. Basándonos en los resultados antropométricos, la glucosa podría resultar la elección más acertada para inducir síndrome metabólico en un modelo animal a través de una dieta que mimetiza de una forma más fiel los hábitos alimentarios de la sociedad actual.



**Figura 23.** Imágenes tomadas en el microscopio óptico (objetivo 40x) de cortes de hígado teñidos con hematoxilina-eosina de los diferentes grupos experimentales al finalizar el estudio. Grupos experimentales: (Imagen A) grupo control (C), (imagen B) grupo de dieta grasa (DG), (imagen C) grupo de dieta grasa con fructosa (DGf), (imagen D) grupo de dieta grasa con glucosa (DGg). Se señala la formación de liposomas con flechas.

Como se ha mencionado en la Introducción de esta Tesis Doctoral, la condición de obesidad se relaciona con un aumento de los valores de presión arterial (Lopes *et al.*, 2016; Seravalle y Grassi, 2017; Esler *et al.*, 2018). Por este motivo se evaluó la presión arterial de los animales de los diferentes grupos experimentales. En la Figura 24 se representan los resultados obtenidos tras realizar la medida directa de la presión arterial y el registro de la frecuencia cardíaca en los diferentes grupos de animales. No se observaron diferencias significativas en los valores de PAS, PAD y PAM en los grupos de DIO al comparar estos valores con los del grupo control, aunque si se observó una disminución significativa de los valores de PAS, PAD y PAM en el grupo DGf respecto al grupo DG. No se observaron diferencias significativas entre grupos al evaluar los resultados de frecuencia cardíaca.



**Figura 24.** Presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD), presión arterial media (PAM) y frecuencia cardíaca (FC) de los diferentes grupos experimentales al finalizar el periodo experimental. Grupos experimentales: Grupo control (C), grupo de dieta grasa (DG), grupo de dieta grasa con fructosa (DGf) y grupo de dieta grasa con glucosa (DGg). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó el test t de Student para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores  $P < 0.05$ . Las letras diferentes representan la existencia de diferencias significativas entre grupos para el mismo parámetro. Ppm: Pulsaciones por minuto.

Los modelos animales utilizados en la literatura actual, en los que se estudia el desarrollo de hipertensión arterial consisten habitualmente en modelos de hipertensión genética (Sun y Zhang, 2005). De hecho, los modelos experimentales en los que se induce la hipertensión arterial mediante una modificación de la dieta de los animales, se utilizan habitualmente dietas con un alto contenido de sal añadida (Sun y Zhang, 2005). Aunque se han descrito modelos animales en los que la administración de dietas altas en grasa y fructosa pueden inducir el desarrollo de hipertensión y disfunción endotelial, la composición de este tipo de dietas incluyen alrededor del 0.26% de la masa corporal de los animales en forma de sal (Sun y Zhang, 2005; Sharma *et al.*, 2008; Panchal *et al.*, 2011). De hecho, Sharma *et al.*, (2008) realizaron un estudio en el que administraron dietas con alto contenido en grasas y azúcares en combinación con diferentes cantidades de sal, y comprobaron que los animales que consumieron las dietas que incluían altas cantidades de sal fueron los únicos que desarrollaron alteraciones cardiovasculares, y este hecho se produjo independientemente del

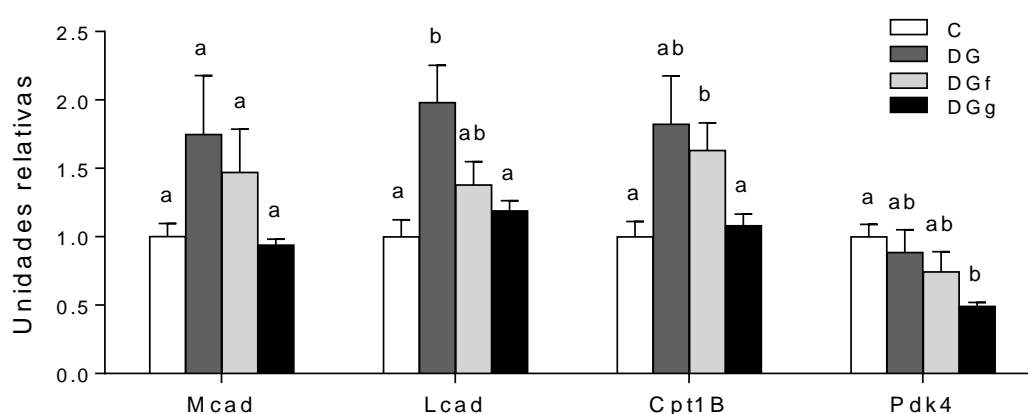


contenido en grasa y azúcar de las dietas que se administraron. En el presente estudio, las dietas administradas a los diferentes grupos de animales no contenían sal añadida, motivo por el que posiblemente ninguno de los grupos de estudio mostró alteraciones en los parámetros evaluados. Es posible que para desarrollar un modelo de DIO que presente hipertensión arterial sea necesario añadir sal a las dietas, o utilizar modelos animales de hipertensión genética, como las ratas SHR e inducir la obesidad en estos animales con dietas similares a las administradas en este estudio.

Teniendo en cuenta que en este estudio no se programó la realización de ensayos que implicaran el desarrollo de actividad física, podría considerarse que todos los grupos experimentales estudiados representan a una población de hábitos sedentarios o de escasa actividad física. En base a esto, el metabolismo basal y la termogénesis serían los dos mecanismos principales de gasto energético de estos animales. Por este motivo, y observando la menor ganancia de peso corporal que presentó el grupo DGf, a pesar de que este grupo de animales había manifestado una ingesta calórica mayor que los animales del grupo control, consideramos importante investigar los mecanismos principales de gasto energético en los grupos de animales del estudio, y para ello se evaluó la expresión de ciertos genes relacionados con el metabolismo oxidativo en el tejido adiposo pardo.

En la Figura 25 se muestran los resultados obtenidos tras analizar la expresión génica relativa en el tejido adiposo pardo de genes implicados en el metabolismo oxidativo. Los genes *Mcad*, *Lcad* y *Cpt1B* representados en la Figura 25 se encuentran implicados en la oxidación de ácidos grasos en el interior mitocondrial. No se observaron diferencias significativas en la expresión génica de *Mcad* entre los diferentes grupos experimentales. La expresión del gen *Lcad* fue significativamente mayor en el grupo DG con respecto al grupo control. No se observaron diferencias significativas para este parámetro en los grupos DGf y DGg con respecto al grupo control, aunque el grupo DGf mostró un ligero aumento de este parámetro con respecto al grupo control. *Cpt1B* mostró una expresión significativamente mayor en el grupo DGf con respecto al grupo control. No se observaron diferencias significativas para este parámetro entre los grupos C, DG y DGg, aunque sí se observó un aumento no significativo pero notable de este valor en el grupo DG con respecto al grupo

control. Por otra parte, el gen *Pdk4*, que se encuentra implicado en la inhibición de la actividad de la enzima piruvato deshidrogenasa, experimentó una reducción significativa de su expresión en el grupo DGg respecto al grupo control. No se observaron diferencias significativas entre los grupos C, DG y DGf, aunque sí se observó una ligera reducción de este parámetro en los grupos DG y DGf con respecto al grupo control.



**Figura 25.** Expresión génica relativa en el tejido adiposo pardo de genes implicados en el metabolismo oxidativo. Grupos experimentales: Grupo control (C), grupo de dieta grasa (DG), grupo de dieta grasa con fructosa (DGf) y grupo de dieta grasa con glucosa (DGg). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó el test de Mann-Whitney para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores  $P < 0.05$ . Las letras diferentes representan la existencia de diferencias significativas entre grupos. Mcad: Acil-CoA deshidrogenasa de cadena media; Lcad: Acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga; Cpt1B: Carnitina palmitoiltransferasa 1B; Pdk4: Piruvato deshidrogenasa quinasa 4.

El aumento de la expresión de los genes *Lcad* y *Cpt1B* en los grupos DG y DGf sugiere la existencia de una mayor oxidación de ácidos grasos en estos grupos de animales, y podría suponer el desarrollo de un mecanismo adaptativo frente a las dietas hipercalóricas, lo que supondría una menor acumulación de ácidos grasos en el tejido adiposo blanco. Cabe destacar que la expresión de estos genes no se vio modificada en el grupo DGg al compararla con la expresión de este gen en el grupo control. La expresión reducida de *Pdk4* en el grupo DGg podría implicar la activación de la enzima piruvato deshidrogenasa y aumentar así la oxidación de glucosa en el tejido adiposo pardo de este grupo experimental. Nuestros resultados concuerdan con los

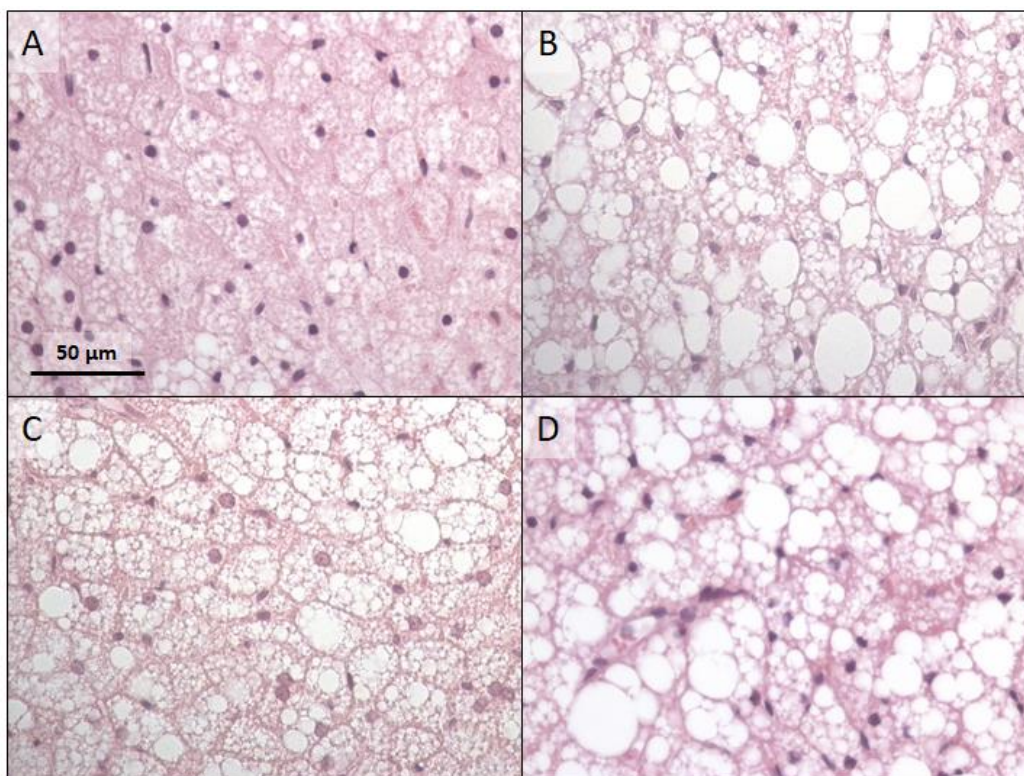
obtenidos por otros grupos de investigación, quienes observaron la inducción de termogénesis tras la administración de dietas altas en grasas y azúcares. Estas dietas provocaron una notable activación de genes marcadores de grasa parda en el tejido adiposo blanco de ratas Wistar (García-Ruiz *et al.*, 2015; Trayhurn, 2017). Este fenómeno se conoce como “pardeamiento del tejido adiposo blanco” o “tejido beige” y tiene como objetivo principal reducir la acumulación de ácidos grasos en los adipocitos y la sobrecarga que se produce en el tejido adiposo blanco durante los eventos de sobrealimentación. Nuestros resultados sugieren, por lo tanto, la existencia de un mecanismo de termogénesis inducida por dieta que, aunque en nuestro estudio no se observa la aparición de depósitos pardos en el tejido adiposo blanco, este mecanismo se manifiesta a través un aumento en la activación de los depósitos de grasa parda interescapulares y un incremento de su actividad oxidativa. Además, la activación de las rutas de oxidación de ácidos grasos parece la vía más efectiva para reducir la inclusión exacerbada de ácidos grasos en el tejido adiposo blanco y el desarrollo de hipertrofia y disfunción de este tejido. En este sentido, se observó una menor ganancia de peso en aquellos grupos que vieron estimulada las vías de oxidación de ácidos grasos (DG y DGf) en comparación con el grupo que sólo vio estimulada la ruta de oxidación de azúcares (DGg).

La termogénesis inducida por dieta y el aumento de la oxidación de ácidos grasos descontrolada podría favorecer el desarrollo de estrés oxidativo debido a la incapacidad de los adipocitos para activar los mecanismos compensatorios celulares encargados de neutralizar la producción excesiva de EROs (Jankovic *et al.*, 2015; Castro *et al.*, 2016; Bhatti *et al.*, 2017). Este es uno de los principales motivos por los que el estrés oxidativo se considera uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de las patologías asociadas a la condición de obesidad. Además, el desarrollo de hipertrofia en el tejido adiposo blanco podría suponer una reducción en su capacidad para almacenar ácidos grasos, lo cual causaría la acumulación ectópica de lípidos en otros tejidos no especializados en el almacenaje lipídico (Grundy, 2016). La acumulación excesiva de ácidos grasos, concretamente en el tejido adiposo pardo, podría reducir la capacidad de este tejido para poner en marcha los mecanismos compensadores antioxidantes encargados de neutralizar las EROs derivadas de la

termogénesis inducida por dieta y que parece encontrarse estimulada en los grupos de DIO. Por este motivo se realizó la evaluación histológica del tejido adiposo pardo de los diferentes grupos experimentales.

En la Figura 26 se muestran imágenes representativas de los cortes histológicos realizados en el tejido adiposo pardo de los diferentes grupos experimentales. En general, se observó un aumento del tamaño de las gotas lipídicas en los cortes histológicos pertenecientes a los grupos DG y DGg respecto al grupo C, siendo este aumento más notable en los cortes histológicos del grupo DGg. Aunque también se observó un aumento del tamaño de las gotas lipídicas en el tejido adiposo pardo del grupo DGf, este aumento fue menor que el observado en los grupos DG y DGg. Es posible que el aumento de la termogénesis inducida por dieta desarrollada en el tejido adiposo pardo de los diferentes grupos experimentales, en combinación con la mayor hipertrofia de los adipocitos pardos observada en el tejido de los grupos DG y DGg implique un riesgo mayor para el desarrollo de disfunción del tejido adiposo pardo, y este tejido tenga una menor capacidad para llevar a cabo la reparación de la maquinaria celular responsable del metabolismo oxidativo, aumentando así la liberación de EROs y agravando el desarrollo de estrés oxidativo a nivel sistémico.

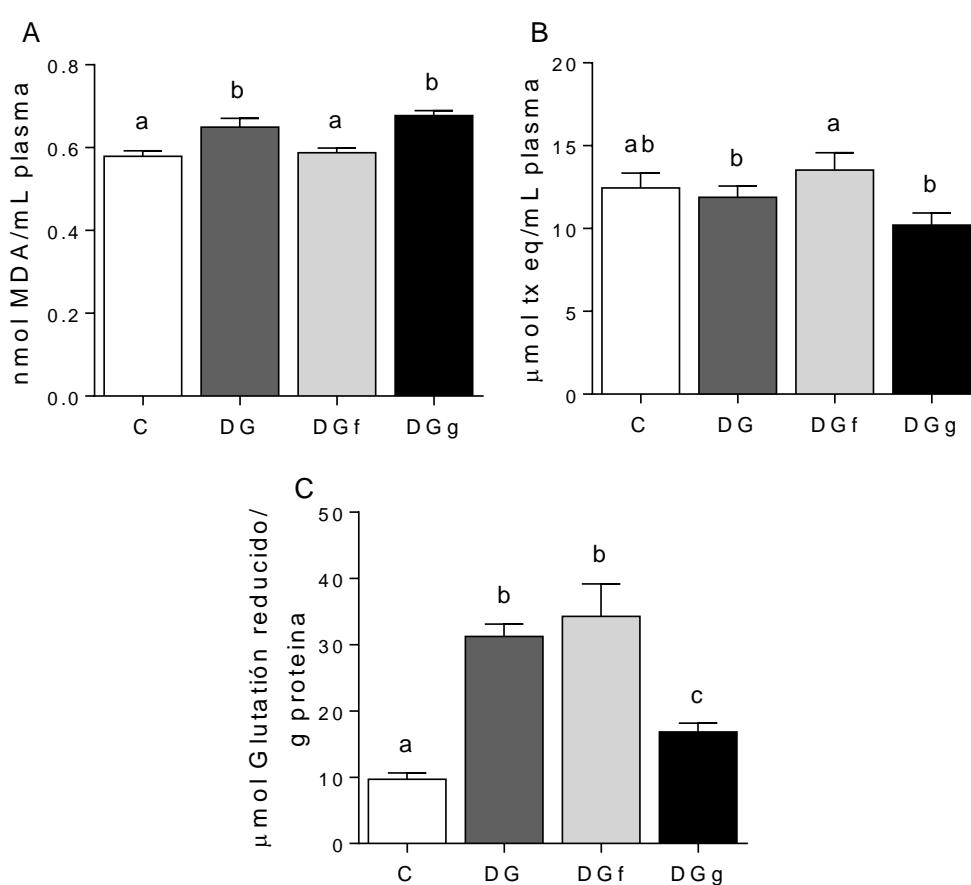
El estrés oxidativo se produce principalmente como consecuencia de la disfunción mitocondrial que ocurre tras un periodo en el que existe una demanda elevada de metabolismo oxidativo. Este proceso se encuentra fuertemente ligado al desarrollo de las alteraciones asociadas al síndrome metabólico. El consumo energético excesivo durante periodos prolongados de tiempo produce un aumento del metabolismo oxidativo como un mecanismo de defensa cuyo objetivo principal es limitar la sobrecarga de los adipocitos. Sin embargo, cuando este aumento del metabolismo oxidativo se combina con una defensa antioxidante intracelular escasa, puede causar una producción excesiva de EROs y provocar daños en las moléculas que componen las estructuras celulares (Bonomini *et al.*, 2015; Bhatti *et al.*, 2017; Boulinguez *et al.*, 2017). Por ello, se decidió investigar el estado redox de los diferentes grupos experimentales, y se analizaron para ello marcadores de estrés oxidativo. También se evaluó la capacidad antioxidante del plasma.



**Figura 26.** Imágenes tomadas en el microscopio óptico (objetivo 40x) de cortes de tejido adiposo pardo teñidos con hematoxilina-eosina de los diferentes grupos experimentales al finalizar el estudio. Grupos experimentales: (A) grupo control (C), (B) grupo de dieta grasa (DG), (C) grupo de dieta grasa con fructosa (DGf), (D) grupo de dieta grasa con glucosa (DGg).

En la Figura 27 se representan los diferentes marcadores de estrés oxidativo evaluados en los diferentes grupos animales al finalizar el periodo experimental. Se observó un aumento significativo de los niveles de malondialdehído (MDA) en el plasma de los grupos DG y DGg respecto al grupo control (Figura 27A). No se observaron modificaciones significativas de este parámetro en el grupo DGf al compararlo con el grupo control. Respecto a la capacidad antioxidante evaluada en el plasma de los grupos de DIO, aunque no se observaron diferencias significativas al comparar estos valores con los del grupo control (Figura 27B), este parámetro aumentó significativamente en el grupo DGf respecto a los grupos DG y DGg. Todos los grupos de DIO mostraron un aumento significativo de los niveles de glutatión reducido del hígado al comparar estos resultados con los del grupo control (Figura 27C). El grupo DGg mostró valores para este parámetro significativamente menores que los de los grupos DG y DGf.

El MDA es un subproducto o metabolito derivado de la peroxidación lipídica producida por EROs que se ha utilizado ampliamente en la literatura como marcador de estrés oxidativo (Ayala *et al.*, 2014). En este estudio, los grupos DG y DGg aumentaron los niveles plasmáticos de MDA respecto a los grupos C y DGf. Además, el grupo DGf presentó una capacidad antioxidante plasmática mayor, respecto a los grupos DG y DGg. Estos resultados sugieren un desarrollo de estrés oxidativo mayor en los grupos DG y DGg respecto al grupo que consumió una dieta hipergrasa con fructosa.



**Figura 27.** Evaluación de marcadores de estrés oxidativo en plasma e hígado. (A) Niveles de malondialdehído (MDA) en plasma, (B) capacidad antioxidante del plasma y (C) niveles de glutatión reducido en hígado al finalizar el periodo experimental. Grupos experimentales: Grupo control (C), grupo de dieta grasa (DG), grupo de dieta grasa con fructosa (DGf) y grupo de dieta grasa con glucosa (DGg). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó el test t de Student para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores  $P < 0.05$ . Las letras diferentes representan la existencia de diferencias significativas entre grupos.

En respuesta al estrés oxidativo, la célula presenta mecanismos antioxidantes de origen enzimático (superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasas...), y sistemas no enzimáticos como el glutatión reducido (Xu *et al.*, 2010). El glutatión reducido es un tripéptido compuesto por tres aminoácidos (ácido glutámico, glicina y cisteína), que funciona como un agente reductor no enzimático. El glutatión reducido es un componente de la defensa antioxidante celular que se oxida con la finalidad de neutralizar las EROs producidas durante el metabolismo oxidativo, en una reacción mediada principalmente por la enzima glutatión peroxidasa (McMurray *et al.*, 2016). Este péptido puede considerarse el principal antioxidante intracelular y está controlado homeostáticamente tanto fuera como dentro de la célula, de forma que se utiliza y regenera para mantener niveles adecuados de EROs en todo momento. Desde el hígado, el glutatión reducido puede exportarse además a otros lugares del organismo, siempre y cuando sus niveles sean adecuados. Los resultados obtenidos en los diferentes grupos experimentales sugieren que el grupo DGg, además de aumentar los niveles de peroxidación lipídica y, en consecuencia, el estado oxidativo de los animales, posee una defensa antioxidante plasmática y tisular menos efectiva que el resto de grupos experimentales de DIO. Nuestros resultados concuerdan con los de otros autores que también han observado un incremento en los niveles de glutatión reducido tras la administración de dietas que contienen un 60% de fructosa (Shawky *et al.*, 2014). Sin embargo, la participación del glutatión reducido es controvertida, ya que en otros estudios se ha observado una reducción significativa de los niveles de este tripéptido en el hígado tras la administración de dietas de composición similar (Maithilikarpagaselvi *et al.*, 2016; Putakala *et al.*, 2017).

En la aparición y desarrollo de estrés oxidativo ocupan un papel esencial los procesos de mitogénesis y las rutas de señalización de dinámicas mitocondriales. Concretamente, los procesos de fusión y fisión mitocondrial se encargan principalmente de la reparación de la maquinaria defectuosa de las mitocondrias para evitar su disfunción y con ello la liberación descontrolada de EROs al citoplasma (Wada y Nakatsuka, 2016; Bhatti *et al.*, 2017). Además, la biogénesis mitocondrial se ocupa del desarrollo y producción de nuevas mitocondrias, con el fin de mantener estable el número y tamaño mitocondrial dentro de la célula. Este proceso también se ocupa de

aumentar el número de estos orgánulos en los casos en los que existe más demanda oxidativa (Jornayvaz y Shulman, 2010; Bhatti *et al.*, 2017). Por todo ello, se decidió investigar si alguno de estos procesos que ocurren en la mitocondria puede estar alterado en los diferentes modelos de DIO. Para ello se llevó a cabo el análisis, en tejidos oxidativos tales como el tejido adiposo pardo y el tejido muscular, de la expresión de varios genes que están implicados en la señalización de mitogénesis y dinámicas mitocondriales.

En la Tabla 15 se muestran los resultados obtenidos tras analizar, en el tejido adiposo pardo y en el tejido muscular, la expresión de genes implicados en la activación y señalización de mitogénesis (PGC1 $\alpha$ , PGC1 $\beta$ , Tfam, Nrf1, Tfb2m) y la expresión de genes implicados en las dinámicas mitocondriales (Mfn2, OPA1). El grupo DG mostró un aumento significativo de la expresión de los genes PGC1 $\alpha$  y PGC1 $\beta$  en el tejido adiposo pardo respecto al grupo control, además de un ligero aumento de la expresión de otros genes evaluados como Mfn2, OPA1 y Nrf1. El grupo DGf mostró también un aumento significativo en la expresión del gen PGC1 $\beta$  en el tejido adiposo pardo, y se observó una disminución significativa en la expresión de los genes Mfn2 y Tfb2m en este tejido, al comparar estos valores con los del grupo control. El grupo DGg mostró una reducción significativa de la expresión de casi todos los genes evaluados en el tejido adiposo pardo, a excepción del gen PGC1 $\beta$  que no vio modificada su expresión. Respecto a los genes evaluados en el tejido muscular, el grupo DG mostró únicamente una reducción significativa de la expresión de PGC1 $\alpha$  respecto al grupo control. En el grupo DGf se observó una reducción significativa de todos los genes evaluados en el tejido muscular respecto al grupo control (PGC1 $\alpha$ , PGC1 $\beta$  y Mfn2), y el grupo DGg mostró una reducción significativa de la expresión de los genes PGC1 $\alpha$  y Mfn2 respecto al grupo control.



**Tabla 15.** Expresión génica relativa en tejido adiposo pardo y tejido muscular de genes reguladores de mitogénesis y dinámicas mitocondriales. Grupos experimentales: Grupo control (C), grupo de dieta grasa (DG), grupo de dieta grasa con fructosa (DGf) y grupo de dieta grasa con glucosa (DGg). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó el test de Mann-Whitney para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores  $P < 0.05$ . Las letras diferentes representan la existencia de diferencias significativas entre grupos. PGC1 $\alpha$ : Coactivador 1 $\alpha$  de PPAR $\gamma$ ; PGC1 $\beta$ : Coactivador 1 $\beta$  de PPAR $\gamma$ ; Mfn2: Mitofusina 2; Tfam: Factor de transcripción A mitocondrial; OPA1: Proteína de atrofia óptica 1; Tfb2m: Factor de transcripción 2B mitocondrial.

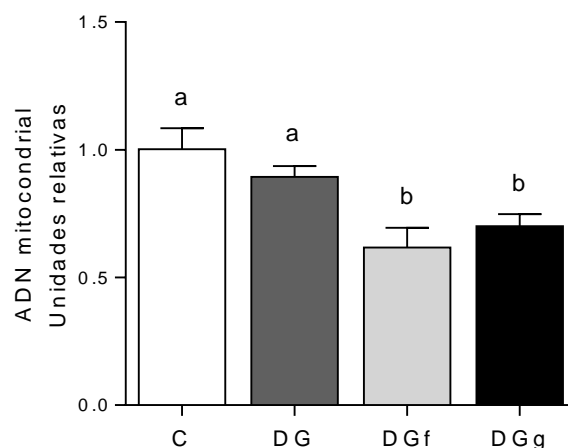
Tejido adiposo pardo (n $\geq$ 6)				
	C	DG	DGf	DGg
PGC1 $\alpha$	1.00 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	1.60 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	0.58 $\pm$ 0.04 <sup>ac</sup>	0.60 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>
PGC1 $\beta$	1.00 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	1.89 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>	1.54 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	0.99 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>
Mfn2	1.00 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	1.28 $\pm$ 0.24 <sup>ab</sup>	0.64 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>	0.72 $\pm$ 0.03 <sup>bc</sup>
Tfam	1.00 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	1.00 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	0.83 $\pm$ 0.14 <sup>ab</sup>	0.52 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>
OPA1	1.00 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	1.22 $\pm$ 0.46 <sup>ab</sup>	0.62 $\pm$ 0.21 <sup>ab</sup>	0.53 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>
Nrf1	1.00 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	1.22 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	0.91 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	0.64 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>
Tfb2m	1.00 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	1.10 $\pm$ 0.27 <sup>ab</sup>	0.60 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	0.69 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>
Tejido muscular (n $\geq$ 6)				
	C	DG	DGf	DGg
PGC1 $\alpha$	1.00 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.58 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	0.20 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	0.74 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>
PGC1 $\beta$	1.00 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.72 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	0.042 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	1.02 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
Mfn2	1.00 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	1.06 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.22 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.79 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>

Los resultados observados sugieren que las rutas metabólicas que posibilitan la biogénesis mitocondrial y las dinámicas mitocondriales podrían encontrarse reguladas a la baja en el tejido adiposo pardo del grupo DGg, lo que supondría una menor capacidad de reparación mitocondrial y esto ocasionaría una mayor liberación de EROs debido al desarrollo de disfunción mitocondrial (Jornayvaz y Shulman, 2010; Wada y Nakatsuka, 2016; Bhatti *et al.*, 2017). Por otra parte, los grupos DG y DGf mostraron una regulación normalizada o incluso aumentada de la expresión de estos genes en el tejido adiposo pardo, lo que sugiere una mayor capacidad de reparación mitocondrial, menor liberación de EROs y, en consecuencia, menos estrés oxidativo. Por otra parte, los resultados observados en el tejido muscular de los diferentes grupos experimentales muestran una posible disfunción mitocondrial, especialmente acusada en el tejido muscular del grupo DGf. Otros investigadores han observado también una reducción significativa de la expresión de genes oxidativos en el músculo esquelético de ratones expuestos a dietas altas en fructosa (Motta *et al.*, 2017), y también en

humanos tras 7 días de ingerir una dieta alta en fructosa (Seyssel *et al.*, 2016). Aunque los mecanismos implicados en estos procesos no se conocen con exactitud, se ha propuesto que el efecto de la fructosa sobre el músculo esquelético puede deberse a la formación de productos de glicación avanzada, que activan las rutas de lipogénesis e inhiben las rutas oxidativas en múltiples tejidos, incluido el músculo esquelético (Mastrocola *et al.*, 2016).

En conjunto, los resultados observados en el tejido adiposo pardo del grupo DGg podrían indicar un deterioro de los mecanismos de reparación y biogénesis mitocondrial, lo que sugiere una mayor capacidad de la glucosa para inducir la disfunción mitocondrial observada al combinarse con una dieta hipergrasa y, por tanto, una mayor capacidad para inducir estrés oxidativo en tejidos y órganos. Por otro lado, los resultados observados en los grupos DG y DGf parecen indicar que se está desarrollando un mecanismo compensatorio, mediante la estimulación de las vías de reparación y biogénesis mitocondrial en el tejido adiposo pardo para limitar el desarrollo de estrés oxidativo en órganos especializados en el gasto energético. En el tejido muscular estos mecanismos de reparación son menos patentes, y en el grupo DG no se observaron modificaciones en la expresión de estos genes en este tejido, y los grupos DGf y DGg manifestaron una menor capacidad de reparación. Estos resultados podrían derivar, en última instancia, en la activación de rutas lipogénicas y acumulación ectópica de ácidos grasos en estos tejidos.

Con el objetivo de comprobar la afectación de la biogénesis mitocondrial, se decidió cuantificar la cantidad de mitocondrias en el tejido adiposo pardo de los diferentes grupos experimentales mediante qPCR. La Figura 28 representa la cuantificación de ADNm en el tejido adiposo pardo de todos los grupos experimentales. Se observa una disminución significativa de la cantidad de ADNm en el tejido adiposo pardo de los grupos DGf y DGg. Este resultado confirma lo analizado en la expresión génica de este tejido y que implicaría el desarrollo de disfunción mitocondrial en el tejido adiposo pardo de ambos grupos experimentales.

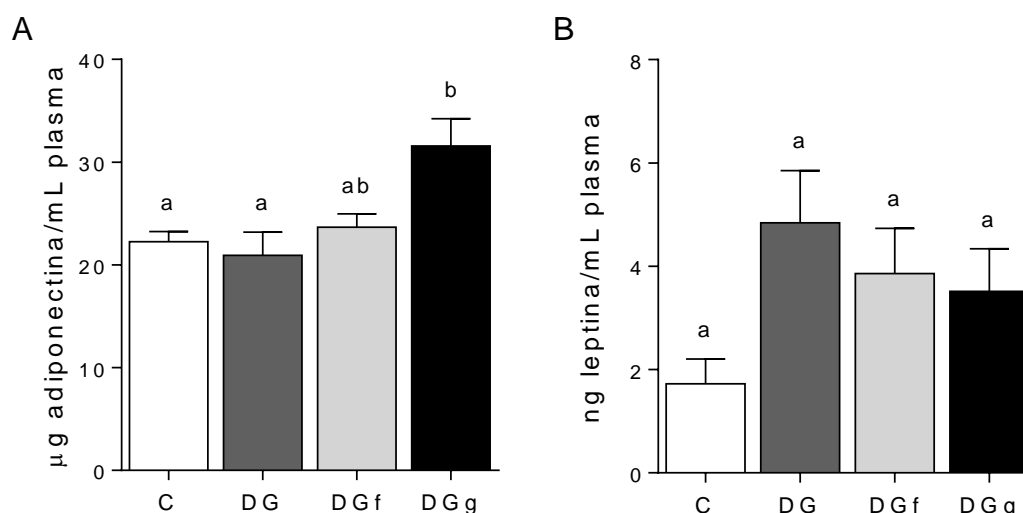


**Figura 28.** Cuantificación del ADN mitocondrial mediante qPCR en tejido adiposo pardo de los grupos experimentales al finalizar el estudio. Grupos experimentales: Grupo control (C), grupo de dieta grasa (DG), grupo de dieta grasa con fructosa (DGf) y grupo de dieta grasa con glucosa (DGg). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó el test de Mann-Whitney para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores  $P < 0.05$ . Las letras diferentes representan la existencia de diferencias significativas entre grupos.

Hoy en día se conoce bastante bien la actividad endocrina que ejerce el tejido adiposo como sistema regulador de actividades metabólicas relacionadas con la ingesta calórica y el gasto energético, actividad principalmente mediada por moléculas llamadas adipocitoquinas (Kuroda y Sakaue, 2017). De entre las adipocitoquinas cuya función se conoce mejor, destacan la leptina y la adiponectina. Ambas moléculas se suelen utilizar como marcadores de obesidad, además de estar estrechamente relacionadas con el desarrollo de inflamación, insulinoresistencia y síndrome metabólico (Aguilar-Valles *et al.*, 2015; Fasshauer y Blüher, 2015; Grundy, 2015; Lopes *et al.*, 2016). Con el objetivo de conocer la implicación de estas adipocitoquinas en los diferentes modelos experimentales de DIO, se determinaron los niveles de ambas adipocitoquinas en el plasma, así como su expresión génica en el tejido adiposo epididimal.

En la Figura 29 se muestran los resultados referentes a los niveles de adiponectina y leptina en el plasma de los diferentes grupos experimentales. Se observó un aumento significativo de los niveles de adiponectina en el plasma de los animales del grupo DGg respecto al resto de grupos experimentales. No se observaron

diferencias significativas en los niveles de leptina en el plasma de los diferentes grupos experimentales, aunque sí se observó una tendencia al aumento en los valores de este parámetro en los grupos de DIO respecto a los valores del grupo control.



**Figura 29.** Niveles de marcadores de adiposidad. (A) Niveles de adiponectina y (B) niveles de leptina en plasma al finalizar el periodo experimental. Grupos experimentales: Grupo control (C), grupo de dieta grasa (DG), grupo de dieta grasa con fructosa (DGf) y grupo de dieta grasa con glucosa (DGg). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó el test t de Student para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores  $P < 0.05$ . Las letras diferentes representan la existencia de diferencias significativas entre grupos.

En la Tabla 16 figuran los resultados del análisis de la expresión génica relativa en el tejido adiposo epididimal de los genes de adiponectina y leptina, así como del receptor de leptina. Se observó una disminución significativa de la expresión del gen de adiponectina en todos los grupos de DIO al comparar estos valores con los del grupo control. El gen de leptina mostró una reducción significativa de su expresión en el tejido adiposo epididimal de los grupos DG y DGf al compararlos con el grupo control. El grupo DGg no mostró variaciones significativas en la expresión del gen de leptina respecto al grupo control. No se observaron diferencias significativas en la expresión del gen del receptor de leptina entre los grupos de DIO y el grupo control,

aunque el grupo DG mostró un aumento mayor en la expresión de este gen respecto a los grupos DGf y DGg.

**Tabla 16.** Expresión génica relativa en el tejido adiposo epididimal de genes marcadores de adiposidad: adiponectina, leptina y receptor de leptina al finalizar el estudio. Grupos experimentales: Grupo control (C), grupo de dieta grasa (DG), grupo de dieta grasa con fructosa (DGf) y grupo de dieta grasa con glucosa (DGg). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó el test de Mann-Whitney para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores  $P < 0.05$ . Las letras diferentes representan la existencia de diferencias significativas entre grupos.

Expresión génica	Grupo			
Tejido adiposo epididimal				
Unidades relativas	C	DG	DGf	DGg
Adiponectina	$1.00 \pm 0.09^a$	$0.43 \pm 0.06^b$	$0.42 \pm 0.06^b$	$0.53 \pm 0.07^b$
Leptina	$1.00 \pm 0.15^a$	$0.43 \pm 0.07^b$	$0.42 \pm 0.07^b$	$0.76 \pm 0.09^a$
Receptor de leptina	$1.00 \pm 0.17^{ab}$	$1.32 \pm 0.10^b$	$0.71 \pm 0.06^a$	$0.98 \pm 0.10^a$

Los resultados obtenidos en los marcadores de adiposidad evaluados mostraron un aumento de los niveles de adiponectina plasmática en el grupo DGg. Algunos investigadores han descrito un descenso en los niveles plasmáticos de adiponectina en situaciones de obesidad y síndrome metabólico, descenso que contribuye al establecimiento de insulinoresistencia (Lopes *et al.*, 2016). Sin embargo, otros investigadores han observado un resultado similar al obtenido en esta Tesis Doctoral, con niveles de adiponectina en plasma elevados, tanto en animales de experimentación como en sujetos humanos (Garcés-Rimón *et al.*, 2016a; Singh *et al.*, 2016; Aslam y Madhu, 2017). Este aumento de los niveles de adiponectina en plasma se ha relacionado con etapas tempranas del desarrollo de síndrome metabólico (Singh *et al.*, 2016), o con la presencia de situaciones de ganancia de peso corporal (Aslam y Madhu, 2017). De hecho, se ha observado que el deterioro en la producción de adiponectina y el descenso de sus niveles en plasma podría ocurrir sólo tras el establecimiento del síndrome metabólico (Aslam y Madhu, 2017). Aunque los mecanismos implicados en este proceso no se conocen en profundidad, se ha propuesto el desarrollo de resistencia a la adiponectina como una de las posibles causas, lo que podría provocar la acumulación de esta adipocitoquina en la circulación

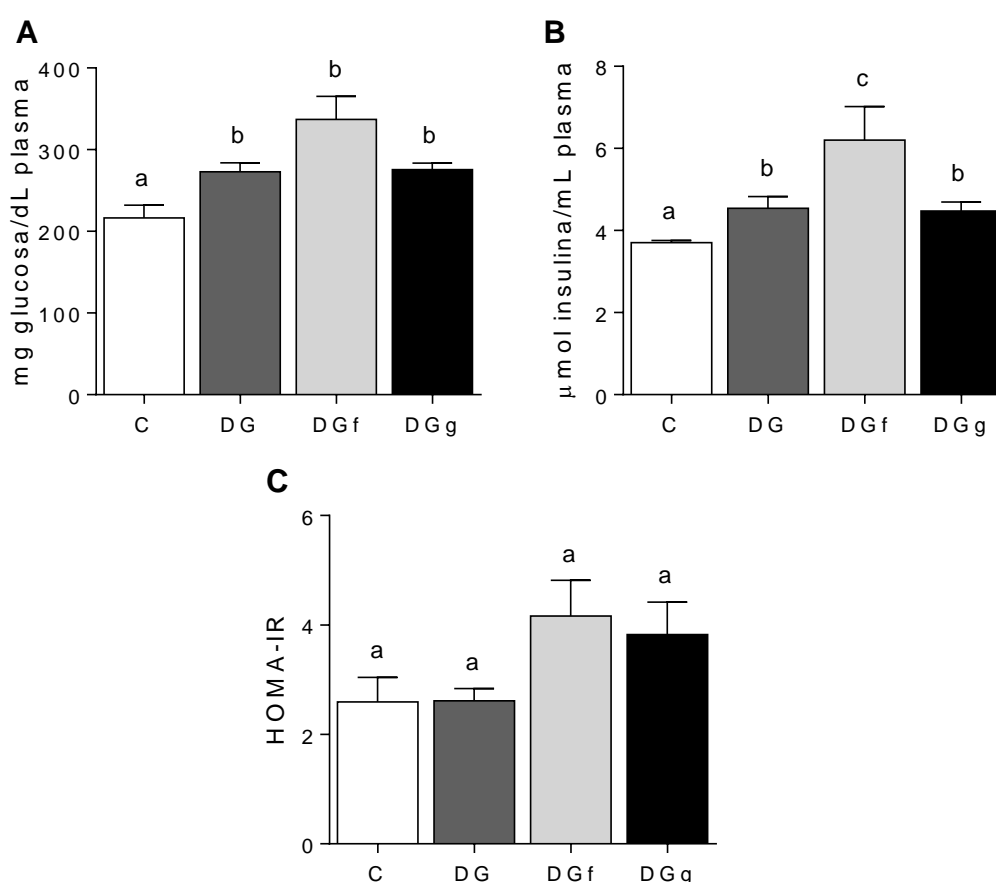
sistémica. Tsuchida *et al.* (2004), observaron una menor expresión de los receptores de adiponectina en animales genéticamente obesos y sugirieron este evento como uno de los mecanismos mediante los cuales los animales desarrollaron resistencia a la adiponectina. En nuestro estudio no se evaluó, sin embargo, la expresión de los receptores de adiponectina en el tejido adiposo epididimal, aunque sí se observó una menor expresión del gen de adiponectina en todos los grupos de DIO. Esto probablemente sea consecuencia de la puesta en marcha de un mecanismo de retroalimentación, en el que los elevados niveles de adiponectina en plasma, regulan a la baja la expresión de este gen.

Por otro lado, y a pesar de que los resultados no mostraron diferencias significativas en cuanto a los valores de leptina plasmáticos, sí se observó una tendencia al incremento de los niveles de leptina en el plasma de todos los grupos de DIO (Figura 29B). Ya se ha mencionado en la introducción de esta Tesis Doctoral que los pacientes diagnosticados de síndrome metabólico desarrollan habitualmente resistencia a esta adipocitoquina, lo que provoca su acumulación en el plasma sin que pueda llegar a ejercer su función anorexigénica. Por ello, además de la expresión del gen de leptina en el tejido adiposo blanco, se decidió valorar la expresión del receptor de esa adipocitoquina en este tejido en todos los grupos experimentales. El aumento de la expresión del receptor de leptina en el grupo DG sugiere una posible sensibilización a la leptina, que podría contrarrestar la menor expresión de esta adipocitoquina observada en este grupo experimental, para intentar permitir el correcto desarrollo de la señal anorexigénica. En cuanto al grupo DGf, si bien este grupo no modificó la expresión del receptor de leptina, sí se observó una menor expresión en el gen de leptina, lo que podría derivar en una menor acumulación de esta adipocitoquina en el plasma, reduciendo así su señal proinflamatoria. Sin embargo, el grupo DGg no mostró variaciones significativas en el gen de leptina y tampoco en el de su receptor. La tendencia al aumento observada en los niveles de leptina del plasma en todos los grupos de DIO, nos permite postular la posible acumulación en el plasma de leptina o leptinemia, que se da de forma habitual en situaciones de obesidad, y que probablemente ocurra en situaciones experimentales similares a las observadas en nuestro estudio, pero más prolongadas en el tiempo.

Los resultados observados en los niveles de estas dos adipocitoquinas, adiponectina y leptina, indican que la acumulación de adiponectina en el plasma del grupo DGg puede deberse al desarrollo de resistencia a esta adipocitoquina, lo que limitaría la actividad antiinflamatoria y antidiabética que ejerce esta molécula en el organismo (Aguilar-Valles *et al.*, 2015). La combinación de esta situación con la acumulación de leptina en plasma derivaría en la activación de rutas metabólicas de inflamación (Aguilar-Valles *et al.*, 2015), y se podría sugerir que el consumo de glucosa combinado con una dieta hipergrasa produce el desarrollo de un estado inflamatorio leve, mucho más notable en el grupo DGg que en el resto de grupos experimentales de DIO. Para confirmar esta hipótesis habría que evaluar la presencia de señal inflamatoria y determinar los niveles de factores de inflamación tales como MCP-1 o TNF $\alpha$ , en el tejido adiposo epididimal. Estos análisis están programados para su realización en el futuro.

El desarrollo de obesidad abdominal y estrés oxidativo, así como la presencia de un cierto grado de inflamación se encuentran relacionados con el desarrollo de insulinoresistencia y, en última instancia, de DM2 (Aydin *et al.*, 2014; Hafizi Abu Bakar *et al.*, 2015). Se decidió por ello, evaluar en qué situación se encuentra el metabolismo de la glucosa en los diferentes modelos experimentales de DIO. En la Figura 30 se muestran los resultados obtenidos tras analizar los niveles de glucosa e insulina en plasma, así como el cálculo del índice HOMA-IR en los diferentes grupos experimentales. Se observa que todos los grupos de DIO aumentaron significativamente los niveles de glucosa en plasma en comparación con el grupo control (Figura 30A). Los grupos de DIO también aumentaron de forma significativa los niveles de insulina en plasma respecto al grupo control (Figura 30B) y, en este caso, fue el grupo DGf el que mostró un aumento mayor de este parámetro respecto a los grupos DG y DGg. No se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos al comparar los valores de HOMA-IR al finalizar el estudio (Figura 30C), pero los grupos DGf y DGg mostraron valores ligeramente superiores de este índice respecto a los grupos C y DG. En nuestro estudio los tres grupos de DIO presentaron niveles plasmáticos elevados de glucosa e insulina pero no se llegaron a encontrar diferencias significativas, aunque si un ligero aumento, en el índice HOMA-IR. Esto sugiere que el

desarrollo de insulinoresistencia se encuentra en una fase temprana. Numerosos estudios han demostrado que el perímetro abdominal se considera un buen factor predictor de la presencia de insulinoresistencia (Wahrenberg *et al.*, 2005). Si relacionamos esto resultados con los obtenidos en el perímetro abdominal, podríamos concluir que el grupo DGg sería el grupo con más riesgo de desarrollar insulinoresistencia.



**Figura 30.** Niveles en plasma de (A) glucosa y (B) insulina y (C) cálculo del índice de resistencia a insulina (HOMA-IR) de todos los grupos al finalizar el periodo experimental. Grupos experimentales: Grupo control (C), grupo de dieta grasa (DG), grupo de dieta grasa con fructosa (DGf) y grupo de dieta grasa con glucosa (DGg). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó el test t de Student para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores  $P < 0.05$ . Las letras diferentes representan la existencia de diferencias significativas entre grupos.

PPAR $\alpha$  es un gen encargado de estimular la oxidación de ácidos grasos y de glucosa en las células a través de diferentes vías de señalización, entre las que se incluye el aumento de la sensibilidad celular a la insulina. La inhibición de este gen se

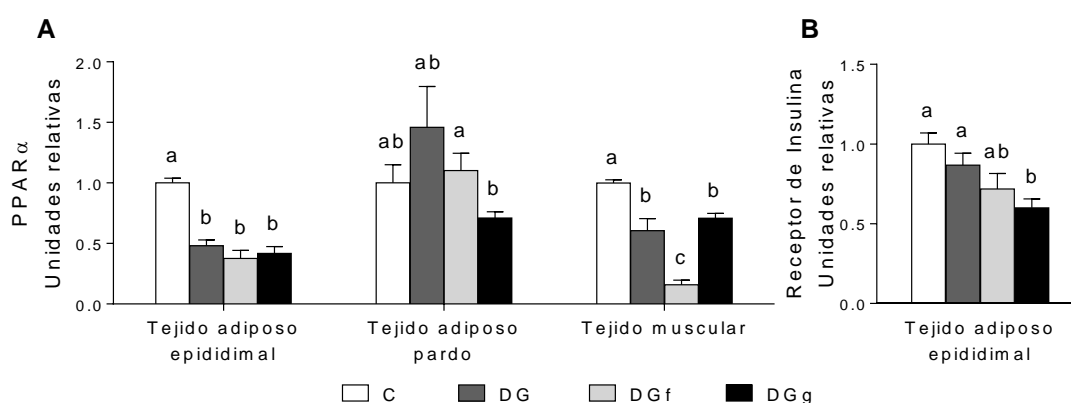


encuentra estrechamente relacionada con el desarrollo de insulinoresistencia (Rakhshandehroo *et al.*, 2010). Se decidió por ello evaluar la expresión de este gen en diferentes tejidos (tejido adiposo blanco, tejido adiposo pardo y tejido muscular). También se decidió evaluar la influencia de la expresión de PPAR $\alpha$  sobre la expresión del gen del receptor de insulina en el tejido adiposo epididimal.

En la Figura 31 se presentan los resultados obtenidos tras analizar la expresión de PPAR $\alpha$  en el tejido adiposo blanco, el tejido adiposo pardo y el tejido muscular, y la expresión del gen del receptor de insulina en el tejido adiposo epididimal. En la figura se observa que la expresión de PPAR $\alpha$  en el tejido adiposo epididimal disminuyó de forma significativa en todos los grupos de DIO respecto al grupo control (Figura 31A). En el tejido adiposo pardo sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la expresión de PPAR $\alpha$  entre los grupos DIO y el grupo control, pero sí se observó una reducción significativa en la expresión de este gen en el grupo DGg respecto al grupo DGf en este tejido. Los resultados obtenidos en el tejido muscular mostraron una reducción significativa de la expresión de PPAR $\alpha$  en todos los grupos DIO respecto al grupo control. Esta reducción fue mucho más acusada en el grupo DGf respecto a los grupos DG y DGg. Respecto a la expresión del receptor de insulina en el tejido adiposo blanco (Figura 31B), el grupo DGg fue el único grupo de DIO que redujo significativamente la expresión de este gen respecto al grupo control, si bien el grupo DGf también mostró una tendencia a reducir la expresión de este gen.

Ya se ha mencionado en la presente Discusión el efecto que tienen los productos de glicación avanzada sobre el metabolismo oxidativo de diferentes tejidos (Mastrocola *et al.*, 2016). Estos productos se producen a una velocidad mayor tras el consumo de dietas altas en fructosa que tras el consumo de dietas altas en glucosa (Singh *et al.*, 2001), e inhiben las rutas oxidativas en el tejido muscular, lo cual podría explicar los resultados obtenidos en la expresión de PPAR $\alpha$  en este tejido. Cabe destacar que todos los grupos de DIO han mostrado una menor expresión de PPAR $\alpha$  en el tejido muscular. Por otra parte, aunque también se ha observado una expresión significativamente menor de PPAR $\alpha$  en el tejido adiposo epididimal, solo se ha encontrado una reducción de la expresión del receptor de insulina en el tejido adiposo epididimal del grupo DGg. Estos resultados sugieren que la administración de la dieta

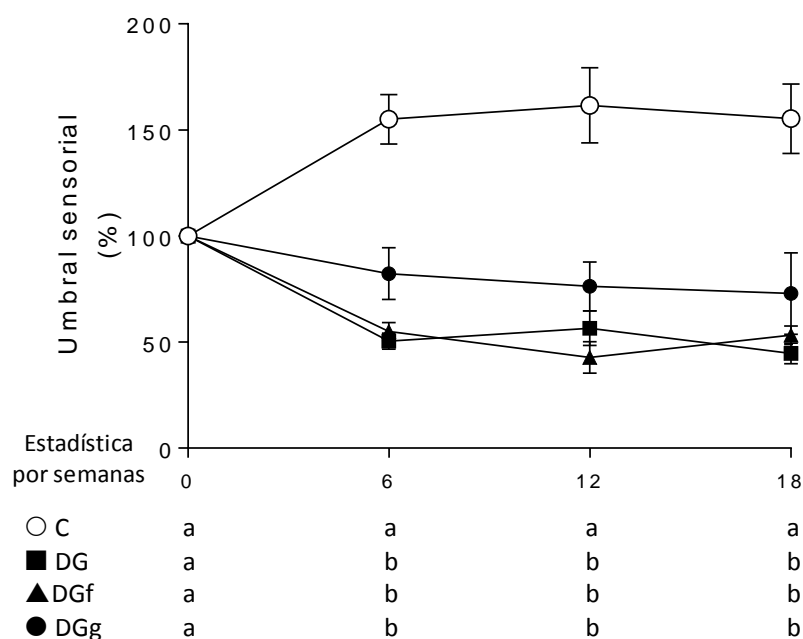
grasa con glucosa podría ocasionar una menor respuesta a la insulina en el tejido adiposo epididimal. Esto supondría no sólo una menor absorción de ácidos grasos desde el torrente sanguíneo al interior de los adipocitos, sino que podría además favorecer su liberación a la circulación sistémica, y ocasionar la acumulación ectópica de ácidos grasos en otros tejidos no especializados como el músculo y empeorar así la situación de obesidad y el desarrollo de síndrome metabólico a largo plazo (Grundy, 2016).



**Figura 31.** Expresión génica de marcadores de insulinoresistencia. (A) Expresión génica de PPAR $\alpha$  en tejido adiposo epididimal, tejido adiposo pardo y tejido muscular y (B) expresión génica del receptor de insulina en tejido adiposo epididimal medidas en todos los grupos al finalizar el periodo experimental. Grupos experimentales: Grupo control (C), grupo de dieta grasa (DG), grupo de dieta grasa con fructosa (DGf) y grupo de dieta grasa con glucosa (DGg). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó el test de Mann-Whitney para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores  $P < 0.05$ . Las letras diferentes representan la existencia de diferencias significativas entre grupos. PPAR $\alpha$ : Receptor activado por proliferadores de peroxisomas  $\alpha$ .

Se ha demostrado que las alteraciones del metabolismo de la glucosa pueden ocasionar daños sobre el sistema nervioso a nivel central y periférico (Cortez *et al.*, 2014; Malone, 2016). La neuropatía periférica se define como el daño en uno o varios componentes de los nervios periféricos que se manifiesta en forma de dolor o hipersensibilidad, y se produce principalmente en las extremidades (Stino y Smith, 2017). Esta alteración se encuentra asociada al desarrollo de DM2, aunque también se ha observado que se manifiesta en pacientes con prediabetes y síndrome metabólico, e incluso en pacientes normoglucémicos que han desarrollado diabetes o prediabetes en años posteriores (Stino y Smith, 2017). La neuropatía periférica se ha relacionado con el aumento del estrés oxidativo que se produce en patologías como la diabetes y la

obesidad (Lupachyk *et al.*, 2012), que podría producir un daño microvascular y ocasionar una disfunción a este nivel (Coppey *et al.*, 2001; Oltman *et al.*, 2008). Otros investigadores han propuesto que esta enfermedad está causada por un aumento en el flujo de la glucosa formada a través de la vía de la aldosa reductasa, lo que provoca un defecto en la actividad de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, que altera la señal de transducción en las fibras nerviosas periféricas (Cheng *et al.*, 2011). Recientemente, se ha relacionado también la presencia de neuropatía con una activación de rutas pro-inflamatorias (Iannitti *et al.*, 2012; Galloway y Chattopadhyay, 2013). En esta Tesis Doctoral la presencia de neuropatía se evaluó mediante el test de los filamentos de Von Frey. La Figura 32 representa la evolución del umbral sensorial en los diferentes grupos experimentales a lo largo de todo el estudio. Se observa que todos los grupos de DIO redujeron su umbral sensorial desde las primeras semanas del estudio, situación que se mantuvo a lo largo de todo el periodo experimental. Estos resultados demuestran el desarrollo de neuropatía periférica en todos los grupos de DIO, lo que, unido a los elevados niveles de glucosa e insulina observados en el plasma nos permiten sugerir que estos animales presentan un estado de prediabetes y que podrían desarrollar DM2 en el futuro.



**Figura 32.** Evolución del umbral sensorial en los diferentes grupos experimentales a lo largo del periodo experimental con respecto a la semana inicial del estudio. Grupos experimentales: Grupo control (C, ○), grupo de dieta grasa (DG, ■), grupo de dieta grasa con fructosa (DGf, ▲), grupo de dieta grasa con glucosa (DGg, ●). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó un análisis de varianza de dos vías seguido del test de Bonferroni para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores  $P < 0.05$ . Las letras diferentes representan la existencia de diferencias significativas entre grupos.

En la definición de síndrome metabólico se encuentran incluidas las alteraciones del metabolismo lipídico, que se utilizan, además, como marcadores clínicos de esta enfermedad, como son la elevación de TG, la disminución de colesterol HDL y la presencia de colesterol LDL. Todas estas alteraciones están relacionadas, además, con la disfunción del tejido adiposo. En esta Tesis Doctoral se analizaron los niveles plasmáticos de TG, colesterol total y colesterol HDL. Además, se analizó la expresión de determinados genes relacionados con el metabolismo de lípidos en el tejido adiposo epididimal. En la Tabla 17 se presentan los resultados obtenidos en diferentes parámetros plasmáticos relacionados con el metabolismo lipídico de los animales. Se observó un aumento significativo de los niveles de TG en el plasma de todos los grupos experimentales de DIO, y este aumento de TG plasmáticos fue similar en todos los grupos de DIO. No se observaron diferencias en los niveles de colesterol total entre los grupos de DIO y el grupo control. Únicamente el grupo DG mostró

niveles significativamente más elevados de colesterol total al comparar estos valores con los del grupo DGg. Respecto al colesterol HDL, no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales, aunque se observó una tendencia a disminuir los valores de colesterol HDL en el grupo DGg. Se calculó asimismo el índice aterogénico de todos los grupos experimentales y, si bien no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales, los grupos DG y DGg mostraron valores ligeramente aumentados de este parámetro respecto a los grupos C y DGf.

**Tabla 17.** Evaluación de los niveles de diferentes marcadores de metabolismo lipídico en plasma al finalizar el estudio. Grupos experimentales: Grupo control (C), grupo de dieta grasa (DG), grupo de dieta grasa con fructosa (DGf) y grupo de dieta grasa con glucosa (DGg). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó el test t de Student para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores  $P < 0.05$ . Las letras diferentes representan la existencia de diferencias significativas entre grupos.

Marcadores de metabolismo lipídico (n $\geq$ 6)				
	C	DG	DGf	DGg
Triglicéridos (mg/dL)	39.00 $\pm$ 2.07 <sup>a</sup>	57.00 $\pm$ 5.60 <sup>b</sup>	56.40 $\pm$ 6.05 <sup>b</sup>	59.83 $\pm$ 7.15 <sup>b</sup>
Colesterol total (mg/dL)	54.17 $\pm$ 4.00 <sup>ab</sup>	64.40 $\pm$ 2.29 <sup>a</sup>	58.80 $\pm$ 5.01 <sup>ab</sup>	51.75 $\pm$ 2.84 <sup>b</sup>
Colesterol HDL (mg/dL)	10.00 $\pm$ 0.99 <sup>a</sup>	10.02 $\pm$ 2.12 <sup>a</sup>	10.44 $\pm$ 0.73 <sup>a</sup>	7.97 $\pm$ 1.41 <sup>a</sup>
Índice aterogénico (CT/HDL)	5.84 $\pm$ 0.97 <sup>a</sup>	7.52 $\pm$ 1.45 <sup>a</sup>	5.65 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	7.03 $\pm$ 1.06 <sup>a</sup>

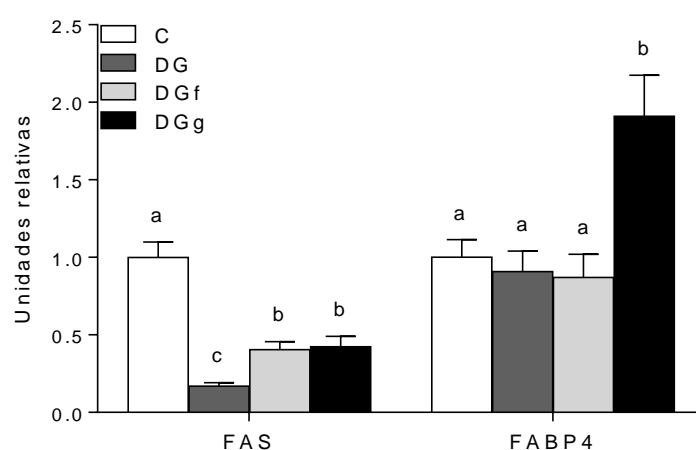
A diferencia de lo que ocurre con la ingesta de glucosa, se ha descrito que la fructosa consumida con la dieta se absorbe rápidamente en el hígado para ser transformada en ácidos grasos que se liberan en forma de TG al torrente sanguíneo, lo que provoca el aumento de los TG plasmáticos y como consecuencia aumenta también el riesgo de desarrollar placas de ateroma y enfermedades cardiovasculares derivadas (Aydin *et al*, 2014; Martins Pereira *et al.*, 2017). Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los TG plasmáticos, en este estudio no se puede atribuir un aumento de los TG plasmáticos al consumo de azúcares, ya que el grupo DG no consumió azúcares con la dieta y aumentó este parámetro de igual manera que el resto de grupos de DIO. Se esperaría sin embargo, que el consumo de fructosa o

glucosa agravara el aumento observado en este parámetro, pero no se han encontrado diferencias significativas en los niveles de TG plasmáticos entre los grupos de animales que consumieron azúcar y el grupo DG. Tampoco se observaron diferencias significativas en los niveles de colesterol total o colesterol HDL entre los grupos de DIO y el grupo control. El colesterol HDL se considera un importante componente de la defensa antioxidante en el organismo, que actúa evitando la oxidación del colesterol LDL plasmático (Avelar *et al.*, 2015). El HDL ejerce su actividad antioxidante gracias a proteínas en su superficie tales como paraoxonasas que son capaces de neutralizar las EROs circulantes (Hansel *et al.*, 2004). Además, otras proteínas presentes en el HDL son capaces de secuestrar especies potencialmente oxidantes, de manera que evitan la oxidación de las LDL circulantes, reduciendo así el riesgo de desarrollar aterosclerosis (Hansel *et al.*, 2004; Avelar *et al.*, 2015; Abbasian *et al.*, 2018). La ligera disminución de los niveles de HDL observada en el grupo DGg, además de colaborar en la reducción de los niveles de colesterol total en plasma, podría estar relacionada con el aumento observado de los marcadores de estrés oxidativo a nivel plasmático (Figura 27). Abbasian *et al.* (2018) observaron de hecho, que los niveles de HDL plasmáticos se encuentran directamente relacionados con la capacidad antioxidante total del plasma, y que existe una relación inversamente proporcional entre los niveles de HDL plasmáticos y los niveles de MDA en humanos.

Como ya se ha mencionado en la Introducción de esta Tesis Doctoral, el tejido adiposo blanco actúa como el principal órgano de reserva energética del organismo y almacena el exceso de energía consumida en forma de TG. Ante un consumo excesivo y continuado de energía, como ocurre durante el desarrollo de obesidad, los procesos de adipogénesis y angiogénesis se deterioran causando la hipertrofia de los adipocitos y el inicio de los procesos de hipoxia previamente descritos (Trayhurn *et al.*, 2008; Lafontan, 2014; Engin, 2017). La hipertrofia de los adipocitos les provoca que tengan una menor sensibilidad a las señales producidas por la insulina, esto produce la activación de las vías lipolíticas y la liberación de ácidos grasos al torrente sanguíneo, y causa la acumulación ectópica de lípidos en órganos no especializados para el almacenamiento energético, lo que termina agravando las complicaciones asociadas al síndrome metabólico (Lafontan, 2014; Fasshauer y Blüher, 2015; Grundy, 2016;

Schrover *et al.*, 2016; Badimon y Cubedo, 2017; Engin, 2017). Como ya se ha observado en la Figura 31, la sensibilidad a la insulina en el tejido adiposo podría haberse reducido en algunos grupos experimentales, y favorecer esa liberación de ácidos grasos al torrente sanguíneo. Teniendo en cuenta esos resultados, se consideró interesante valorar la expresión de genes implicados en la síntesis (FAS) y movilización de ácidos grasos (FABP4) en el tejido adiposo epididimal.

En la Figura 33 se presentan los resultados obtenidos tras la evaluación de la expresión génica de los genes FAS y FABP4 en el tejido adiposo epididimal al finalizar el estudio. Todos los grupos de DIO mostraron una reducción significativa de la expresión de la enzima FAS respecto al grupo control. Entre los grupos de DIO, el grupo DG mostró una expresión significativamente menor de FAS respecto a los grupos DGf y DGg. En cuanto a la expresión de FABP4, el grupo DGg aumentó significativamente la expresión de este gen respecto al resto de grupos experimentales. No se observaron diferencias significativas en la expresión de este gen entre los grupos C, DG y DGf.



**Figura 33.** Expresión génica de FAS y FABP4 en el tejido adiposo epididimal de todos los grupos experimentales al finalizar el periodo experimental. Grupos experimentales: Grupo control (C), grupo de dieta grasa (DG), grupo de dieta grasa con fructosa (DGf) y grupo de dieta grasa con glucosa (DGg). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó el test de Mann-Whitney para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores  $P < 0.05$ . Las letras diferentes representan la existencia de diferencias significativas entre grupos. FAS: Ácido graso sintasa; FABP4: Proteína transportadora de ácidos grasos.

Se ha demostrado que existe una relación inversa entre los niveles de TG en plasma y la expresión génica de la enzima FAS, ya que el exceso de TG circulantes y el estado de obesidad inhiben las rutas lipogénicas en el tejido adiposo, y esto explicaría los resultados obtenidos en nuestro estudio para este parámetro (Mayas *et al.*, 2009; Mayas *et al.*, 2010). Este gen presentó además una expresión mayor en los grupos que consumieron azúcares (DGf y DGg), lo que podría relacionarse con el aumento de los niveles de glucosa plasmática, que estimularían en mayor medida la síntesis *de novo* de ácidos grasos y TG en el tejido adiposo epididimal como mecanismo para reducir los niveles de glucosa circulante. Por otra parte, se observó un aumento significativo en la expresión génica de FABP4 en el grupo DGg, que llegó incluso a duplicar los valores obtenidos en el grupo control para este parámetro. Esta proteína se encarga principalmente de la movilización de ácidos grasos en el interior de los adipocitos, y su mayor expresión se ha relacionado con el desarrollo de insulinoresistencia, hipertrigliceridemia y aterosclerosis (Kralisch y Fasshauer, 2013). Además, desde que en 2006 se descubriera que la proteína FABP4 puede liberarse a la circulación sanguínea y actuar como una adipocitoquina, se ha postulado que puede utilizarse como importante marcador sanguíneo de síndrome metabólico (Xu *et al.*, 2006; Kralisch y Fasshauer, 2013; Furuhashi *et al.*, 2014). Considerando que el grupo DGg es el único que presentó una mayor expresión génica de la proteína FABP4, se podría concluir que el riesgo de desarrollar síndrome metabólico a corto plazo es mayor en el grupo DGg que en los grupos DG y DGf.

En la literatura actual existen algunos trabajos de diferentes grupos de investigación en los que se pone en entredicho la mayor influencia de la fructosa en el desarrollo de síndrome metabólico, en comparación con otros azúcares como la glucosa (Johnston *et al.*, 2013; Rippe y Angelopoulos, 2016a). De hecho, el complejo sistema de regulación del metabolismo energético y del proceso de ganancia de peso corporal, hace improbable que sea un único componente nutricional el causante del problema que se plantea en la sociedad actual respecto al desarrollo de obesidad y síndrome metabólico. Algunos de estos autores relacionan por ello el mayor consumo de azúcares con una mayor ingesta energética y que, en última instancia, es esto lo que deriva en un aumento de peso (Rippe y Angelopoulos, 2016a). De hecho, en la



mayoría de estudios en que utilizan dietas altas en fructosa para inducir síndrome metabólico, insulinoresistencia y/o DM2 en modelos animales (Panchal *et al.*, 2011; Maithilikarpagaselvi *et al.*, 2016; Sah *et al.*, 2016; Putakala *et al.*, 2017), los investigadores utilizan animales de edad avanzada para inducir un importante daño metabólico. Además, la dieta se administra durante periodos de tiempo muy prolongados (más de 30 semanas), y/o se administran cantidades extremadamente altas de fructosa (hasta un 70% del contenido energético de la dieta en forma de fructosa) (Maithilikarpagaselvi *et al.*, 2016; Sah *et al.*, 2016; Putakala *et al.*, 2017). En este estudio se decidió administrar un porcentaje reducido (25%) de fructosa o de glucosa durante veinte semanas a animales jóvenes. Nuestro objetivo no era inducir un daño metabólico grave en los animales, sino mimetizar la exposición a la que está sometida gran parte de la población actual a través del consumo elevado de productos ricos en grasa y azúcares, para seleccionar el modelo más adecuado en el que poder evaluar el efecto de distintos componentes alimentarios con actividad biológica sobre algunas de las complicaciones asociadas al síndrome metabólico. Es importante tener en cuenta que en nuestro estudio hemos observado la aparición de varias de estas alteraciones, algunas de ellas en fases más iniciales, pero que podrían llegar a desarrollarse en su totalidad si se prolongase el periodo experimental durante algunas semanas más. Los resultados obtenidos en este estudio también ponen de manifiesto que las alteraciones cardiometabólicas producidas como consecuencia de la ganancia de peso corporal pueden ser diferentes en tipo y severidad en función de cuál sea el azúcar mayoritario que se haya consumido con la dieta.

Los animales que consumieron una dieta hipergrasa y una solución de glucosa al 25% (DGg), incrementaron su peso corporal y su perímetro abdominal y mostraron un aumento de la adiposidad en el tejido adiposo epididimal. Con respecto a las alteraciones cardiometabólicas evaluadas, este grupo de animales mostró además un aumento en los marcadores del desarrollo de estrés oxidativo, hiperglucemia, dislipidemia y neuropatía periférica. Todas estas alteraciones pueden agravar las complicaciones cardiometabólicas asociadas al desarrollo de síndrome metabólico. Como ya se ha mencionado en la introducción de esta Tesis Doctoral, debido a las restricciones que suponen las cuotas de producción de HFCS existentes en el

continente europeo, los jarabes de fructosa se utilizan en la industria alimentaria con menor frecuencia en Europa y es más común la utilización de sacarosa o productos derivados de glucosa (Hull, 2010). Esto convierte a la población europea en grandes consumidores de glucosa y, en base a los resultados obtenidos en nuestro estudio, esto podría estar contribuyendo al aumento continuado de los índices de obesidad y síndrome metabólico que se vienen confirmando año tras año en Europa (Vishram *et al.*, 2014; Suliga *et al.*, 2016; Han *et al.*, 2017; Pucci *et al.*, 2017; Raposo *et al.*, 2017).

A la vista de los resultados obtenidos, podemos concluir en este estudio que la ingesta de glucosa en combinación con una dieta alta en grasa, ejerce un efecto mayor a la hora de desarrollar algunas de las complicaciones cardiometabólicas que se asocian al síndrome metabólico, y que este modelo podría resultar útil para evaluar el efecto de diferentes tratamientos experimentales basados en la administración de alimentos y/o ingredientes funcionales con actividad biológica. Este nuevo modelo experimental se utilizó en el segundo estudio de esta Tesis Doctoral para evaluar el efecto de un hidrolizado de clara de huevo tratado con pepsina durante 8 horas.

### **4.2. Efecto del consumo del hidrolizado de clara de huevo con pepsina en un modelo experimental de síndrome metabólico inducido por dieta**

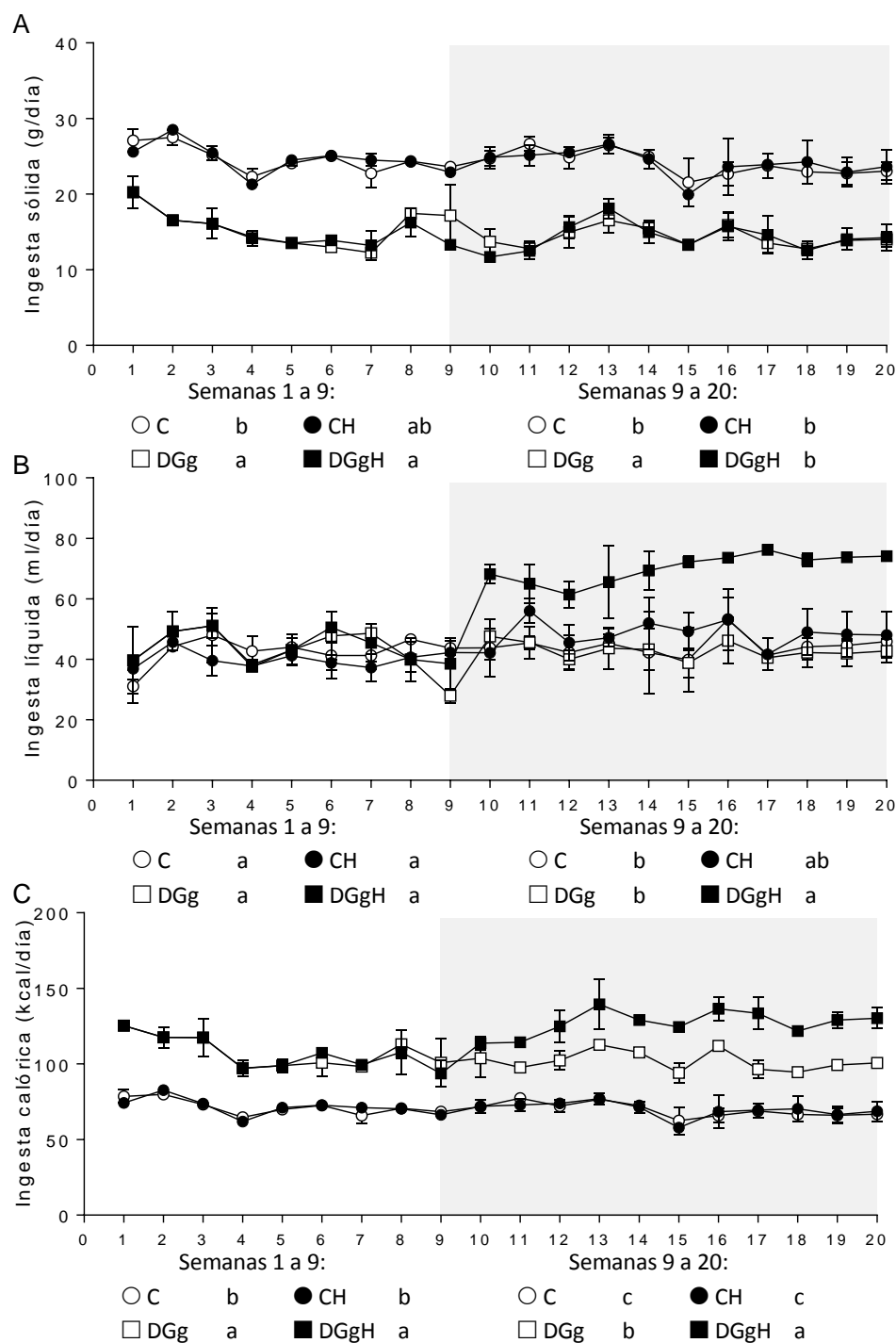
En esta Tesis Doctoral se llevó a cabo un segundo estudio para evaluar el efecto del consumo de un hidrolizado de clara de huevo con pepsina sobre el desarrollo de síndrome metabólico y sus complicaciones asociadas en el modelo experimental de dieta hipergrasa con una solución al 25% de glucosa desarrollado y seleccionado en el estudio anterior. En este estudio se evaluó además la posible aparición de efectos adversos tras la administración del hidrolizado de clara de huevo, motivo por el que este hidrolizado se administró también durante todo el periodo experimental a un grupo de animales control, es decir, a animales sanos que no desarrollaron síndrome metabólico.

Durante el estudio se administró, desde la semana 9 y hasta el final del periodo experimental, 1 g/kg·día de hidrolizado de clara de huevo con pepsina a los correspondientes grupos de animales (CH y DGgH). Cada uno de los grupos de ratas tratados con el hidrolizado de clara de huevo recibió el tratamiento diluido en el agua de bebida. Esta disolución se ajustó semanalmente, para que los animales recibiesen la dosis diaria seleccionada del hidrolizado. La selección de la dosis administrada de hidrolizado de clara de huevo se realizó teniendo en cuenta estudios previos llevados a cabo en nuestro grupo de investigación, en los que se evaluó el efecto antihipertensivo de un hidrolizado de proteínas de clara de huevo con pepsina, similar al utilizado en esta Tesis Doctoral, tras su administración crónica en un modelo animal de hipertensión (Miguel *et al.*, 2006). Esta dosis de hidrolizado se ha utilizado además, en otros estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación para evaluar el efecto que produce la administración del hidrolizado de clara de huevo con pepsina sobre un modelo experimental de intoxicación por mercurio (Rizzetti *et al.*, 2016a; Rizzetti *et al.*, 2016b; Rizzetti *et al.*, 2017a; Rizzetti *et al.*, 2017b), y en un modelo experimental de intoxicación por aluminio (Martinez, 2017). La dosis de hidrolizado administrada en este estudio coincide, además, con la dosis seleccionada por otros investigadores, como la más adecuada para evaluar la actividad biológica de otros hidrolizados derivados de proteínas alimentarias (Liang *et al.*, 2010), y específicamente de hidrolizados de proteínas de huevo en diferentes modelos experimentales (Jahandideh *et al.*, 2016).

A continuación, se exponen los resultados obtenidos en este segundo estudio experimental. Inicialmente se presentarán y discutirán los resultados correspondientes a los registros semanales de ingestas sólida y líquida, y los resultados del cálculo de la ingesta calórica a lo largo del periodo experimental. Seguidamente, se comentarán los resultados del peso corporal, perímetro abdominal y del peso de los órganos de los animales obtenidos al finalizar el estudio. Posteriormente, se expondrán los efectos del hidrolizado de clara de huevo con pepsina sobre algunas de las alteraciones cardiometabólicas que se desarrollan en el modelo experimental de dieta hipergrasa con una solución al 25% de glucosa desarrollado en el estudio anterior y los resultados obtenidos se compararon con el grupo control y el grupo DGg del estudio anterior.

#### **4.2.1. Efecto del consumo del hidrolizado de clara de huevo con pepsina sobre la ingesta y la composición corporal**

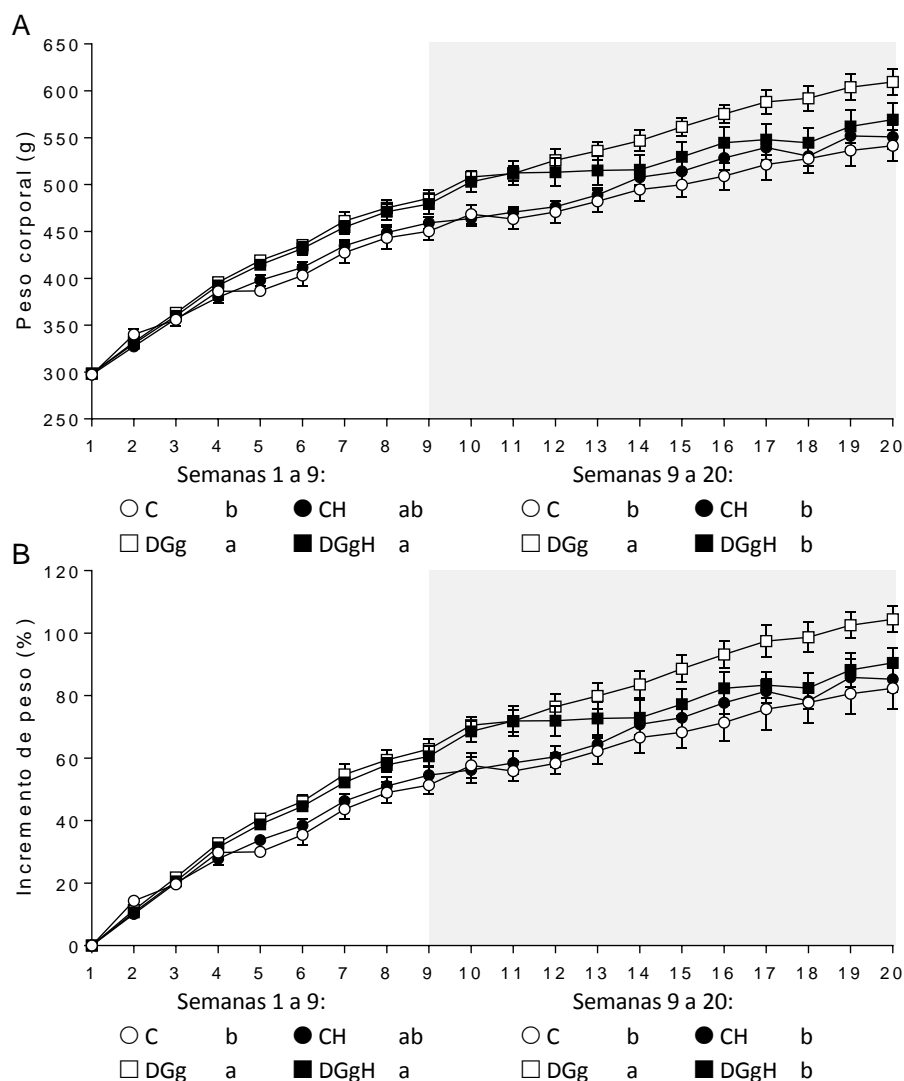
La Figura 34 muestra la evolución de las ingestas sólida, líquida y calórica a lo largo del periodo experimental. En la Figura 34A se observa que el consumo del hidrolizado de clara de huevo con pepsina no produjo cambios en la ingesta sólida de los grupos que recibieron este tratamiento (CH y DGgH). La Figura 34B muestra que la ingesta líquida del grupo DGgH aumentó de forma significativa respecto al resto de grupos desde el inicio del tratamiento con el hidrolizado de clara de huevo. Esto implica que el grupo DGgH recibió también una mayor cantidad de glucosa desde el inicio del tratamiento, al encontrarse este azúcar diluido en el agua de bebida en una proporción constante durante todo el estudio y no se ajustaba semanalmente como se hacía con el hidrolizado de huevo. Como consecuencia de ello, desde la semana 9 y hasta la finalización del estudio, el grupo DGgH experimentó una mayor ingesta calórica con respecto al resto de grupos (Figura 34C). No se observaron modificaciones significativas en la ingesta líquida y en la ingesta calórica del grupo control que consumió el hidrolizado de clara de huevo (CH) respecto al grupo control que no recibió hidrolizado (C).



**Figura 34.** Evolución de las ingestas (A) sólida, (B) líquida y (C) calórica a lo largo del periodo experimental en los diferentes grupos de animales. Grupos experimentales: Grupo control (C, ○), grupo de dieta grasa con glucosa (DGg, □), grupo de dieta grasa con glucosa + 1 g/kg-día de hidrolizado (DGgH, ■) y grupo control + 1 g/kg-día de hidrolizado (CH, ●). El tratamiento con hidrolizado de clara de huevo comenzó a partir de la semana 9 del estudio. Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó un análisis de varianza de dos vías seguido del test de Bonferroni para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores  $P < 0.05$ . Las letras diferentes representan la existencia de diferencias significativas entre grupos.

Las proteínas alimentarias han demostrado inducir saciedad de una manera más efectiva que otros macronutrientes al ser ingeridas con la dieta (Ratliff *et al.*, 2010; König *et al.*, 2012). Concretamente, las proteínas de huevo han demostrado ejercer mayor efecto saciante que otras proteínas alimentarias, motivo por el que el huevo supone una fuente proteica de gran interés nutricional en la elaboración de dietas hipocalóricas para pacientes con sobrepeso (Vander Wal *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2017). Ochiai y Matsuo (2014), ya observaron una reducción de la ingesta en ratas a las que se administraron hidrolizados derivados de clara de huevo. Sin embargo, en nuestro estudio el consumo del hidrolizado de clara de huevo no mostró cambios en la ingesta sólida. La obesidad se produce por un desequilibrio continuado entre la cantidad de energía consumida con la dieta y la energía gastada mediante el desarrollo de ejercicio físico (Rippe y Angelopoulos, 2016a). En nuestro estudio, el consumo aumentado de glucosa observado en el grupo DGgH implica un aumento notable de la ingesta calórica que, al no combinarse con un aumento del ejercicio físico, podría desembocar en una ganancia significativa del peso corporal en este grupo experimental.

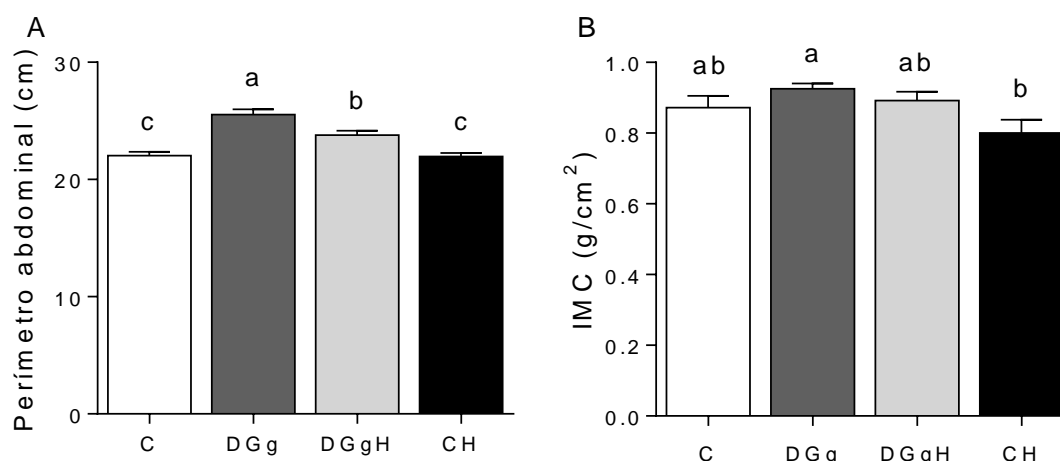
En la Figura 35 se presenta la evolución del peso corporal de los diferentes grupos animales a lo largo del periodo experimental. En ella se observa que durante las semanas previas a la administración de tratamiento los grupos DGg y DGgH aumentaron significativamente su peso corporal y su ganancia de peso respecto al grupo control. Durante la segunda mitad del estudio, el grupo DGg mostró un aumento significativo de su peso corporal y de su ganancia de peso respecto al grupo control. Por el contrario, al iniciar el consumo de hidrolizado de clara de huevo en la semana 9 de estudio el grupo DGgH ralentizó su ganancia de peso, llegando incluso a normalizar su peso corporal respecto al grupo control al finalizar el periodo experimental. No se observaron diferencias significativas entre los grupos C y CH a lo largo de todo el periodo experimental en ninguno de estos parámetros.



**Figura 35.** Evolución del peso corporal a lo largo del periodo experimental en los distintos grupos de animales durante el estudio. (A) Peso neto de los animales, (B) ganancia de peso corporal con respecto a la semana 1 del estudio. Grupos experimentales: Grupo control (C, ○), grupo de dieta grasa con glucosa (DGg, □), grupo de dieta grasa con glucosa + 1 g/kg·día de hidrolizado (DGgH, ■) y grupo control + 1 g/kg·día de hidrolizado (CH, ●). El tratamiento con hidrolizado de clara de huevo comenzó a partir de la semana 9 del estudio. Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó un análisis de varianza de dos vías seguido del test de Bonferroni para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores  $P < 0.05$ . Las letras diferentes representan la existencia de diferencias significativas entre grupos.

Además del aumento de peso corporal, ya hemos mencionado que existen otros parámetros que relacionan el desarrollo de obesidad con el porcentaje de grasa visceral y el riesgo de padecer enfermedades cardiometabólicas, como la medida de perímetro abdominal o el cálculo del IMC. El grupo DGg mostró un aumento

significativo de su perímetro abdominal con respecto al grupo control, como se muestra en la Figura 36A. El perímetro abdominal del grupo DGgH fue significativamente menor respecto a los valores del grupo DGg, aunque este grupo tampoco alcanzó valores de perímetro abdominal similares a los del grupo control. No se observaron diferencias significativas al comparar el IMC entre el grupo control que recibió el hidrolizado de huevo y el IMC del grupo control (Figura 36B).



**Figura 36.** Resultados referentes a la composición corporal de los diferentes grupos experimentales. (A) Perímetro abdominal e (B) índice de masa corporal (IMC) de los diferentes grupos experimentales al finalizar el estudio. Grupos experimentales: Grupo control (C), grupo de dieta grasa con glucosa (DGg), grupo de dieta grasa con glucosa + 1 g/kg·día de hidrolizado (DGgH) y grupo control + 1 g/kg·día de hidrolizado (CH). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó el test t de Student para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores  $P < 0.05$ . Las letras diferentes representan la existencia de diferencias significativas entre grupos.

Como ya se ha explicado anteriormente, el perímetro abdominal se encuentra directamente relacionado con el depósito de tejido adiposo visceral, un tejido que es más activo en la producción de adipocitoquinas implicadas en una gran parte de las alteraciones asociadas al síndrome metabólico (Grundy, 2015). La reducción del peso corporal, combinada con la reducción del perímetro abdominal observada en el grupo DGgH respecto al grupo DGg, permiten suponer que el consumo del hidrolizado de clara de huevo puede ocasionar una reducción del riesgo de desarrollar síndrome metabólico en este modelo experimental.

El tejido adiposo epididimal se considera un depósito graso de tipo visceral en los roedores (Ferrannini *et al.*, 2016). Teniendo en cuenta los resultados observados en



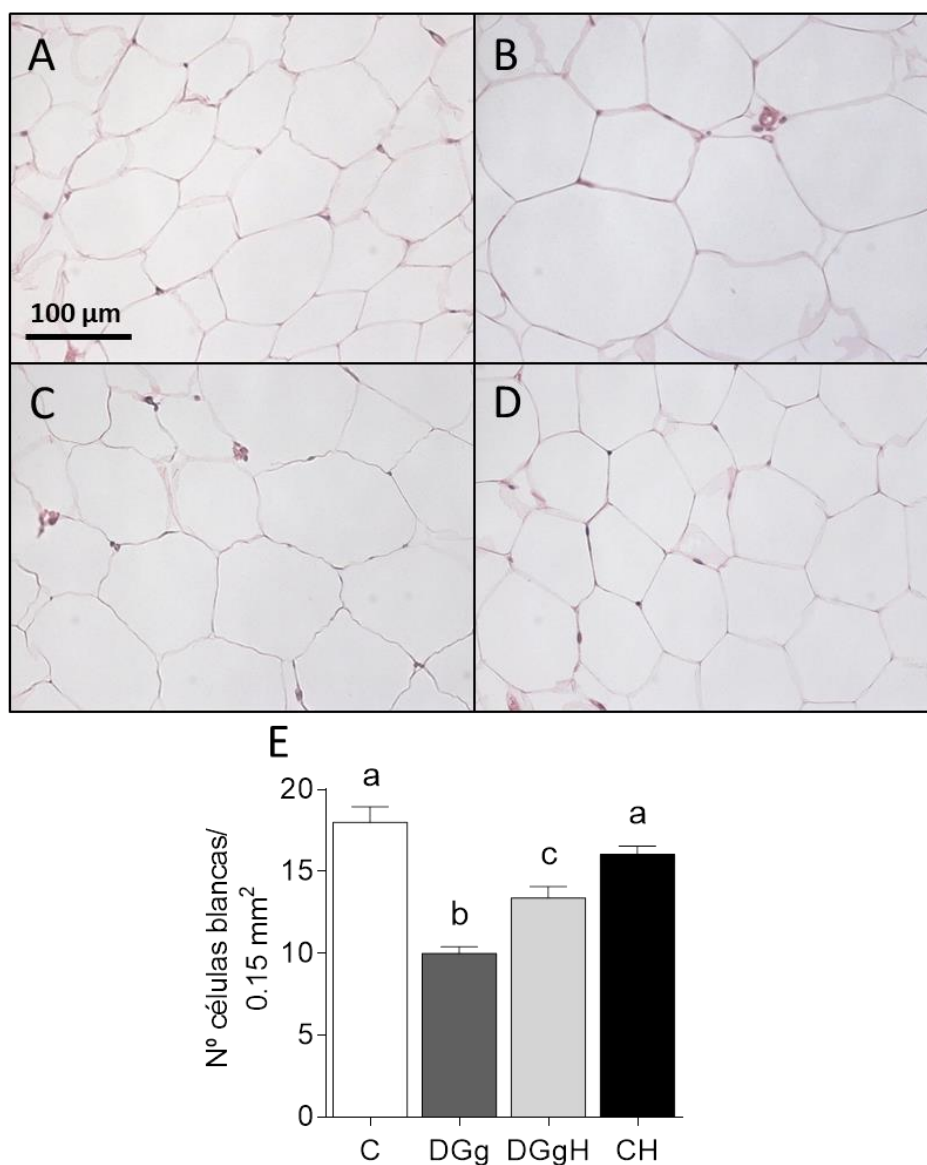
el perímetro abdominal de los animales y los resultados observados en el peso del tejido adiposo epididimal del grupo DGg durante el primer estudio (Tabla 14), consideramos necesario evaluar el efecto del hidrolizado de clara de huevo con pepsina sobre este tejido y sobre otros tejidos diana en la acumulación de depósitos grasos como es el hígado. En la Tabla 18 se representan los pesos relativos del tejido adiposo epididimal y del hígado de los diferentes grupos de animales al finalizar el periodo experimental. Se observa que el grupo DGgH redujo significativamente el aumento de peso del tejido adiposo epididimal que se observó en el grupo DGg al finalizar el periodo experimental, aunque el peso de este tejido en el grupo DGgH no consiguió alcanzar los valores encontrados en el grupo control. No se observaron diferencias significativas en el peso relativo del hígado entre ninguno de los grupos experimentales y el grupo control, y tampoco se observaron diferencias significativas en el grupo DGgH al comparar estos valores con los obtenidos en el grupo DGg.

**Tabla 18.** Pesos relativos de los órganos en los diferentes grupos de animales al finalizar el estudio. Grupos experimentales: Grupo control (C), grupo de dieta grasa con glucosa (DGg), grupo de dieta grasa con glucosa + 1 g/kg·día de hidrolizado (DGgH) y grupo control + 1 g/kg·día de hidrolizado (CH). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó el test t de Student para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores  $P < 0.05$ . Las letras diferentes representan la existencia de diferencias significativas entre grupos.

Órgano (g/cm de tibia) (n $\geq$ 6)	Grupo			
	C	DGg	DGgH	CH
Tejido adiposo epididimal	3.70 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	6.28 $\pm$ 0.52 <sup>b</sup>	5.03 $\pm$ 0.16 <sup>c</sup>	3.52 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>
Hígado	2.90 $\pm$ 0.09 <sup>ab</sup>	3.15 $\pm$ 0.10 <sup>ab</sup>	2.74 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	3.05 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>

La Figura 37 representa imágenes del tejido adiposo blanco tomadas con el microscopio óptico, así como el recuento de adipocitos blancos por campo de observación. En los cortes histológicos se observa un aumento del tamaño de los adipocitos blancos en el grupo DGg en comparación con el grupo C. Los cortes histológicos del grupo DGgH muestran una reducción visible del tamaño de los adipocitos en estos cortes en comparación con los cortes del grupo DGg. Se observó una reducción significativa del número de adipocitos por campo de observación en el grupo DGg en comparación con el grupo control (Figura 37E). El grupo DGgH aumentó significativamente el número de adipocitos respecto al grupo DGg, aunque no alcanzó

valores similares a los del grupo control. No se observaron diferencias significativas entre los grupos C y CH en el tamaño y recuento de adipocitos.



**Figura 37.** Valoración histológica de muestras de tejido adiposo epididimal. (A-D) Imágenes tomadas en el microscopio óptico de cortes de tejido adiposo blanco teñidos con hematoxilina-eosina; (E) recuento del número de adipocitos en tejido adiposo blanco por área de objetivo 20x de los diferentes grupos experimentales al finalizar el estudio. Grupos experimentales: (Imagen A) Grupo control (C), (Imagen B) grupo de dieta grasa con glucosa (DGg), (Imagen C) grupo de dieta grasa con glucosa + 1 g/kg·día de hidrolizado (DGgH) y (Imagen D) grupo control + 1 g/kg·día de hidrolizado (CH). Los datos numéricos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó el test t de Student para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores  $P < 0.05$ . Las letras diferentes representan la existencia de diferencias significativas entre grupos.

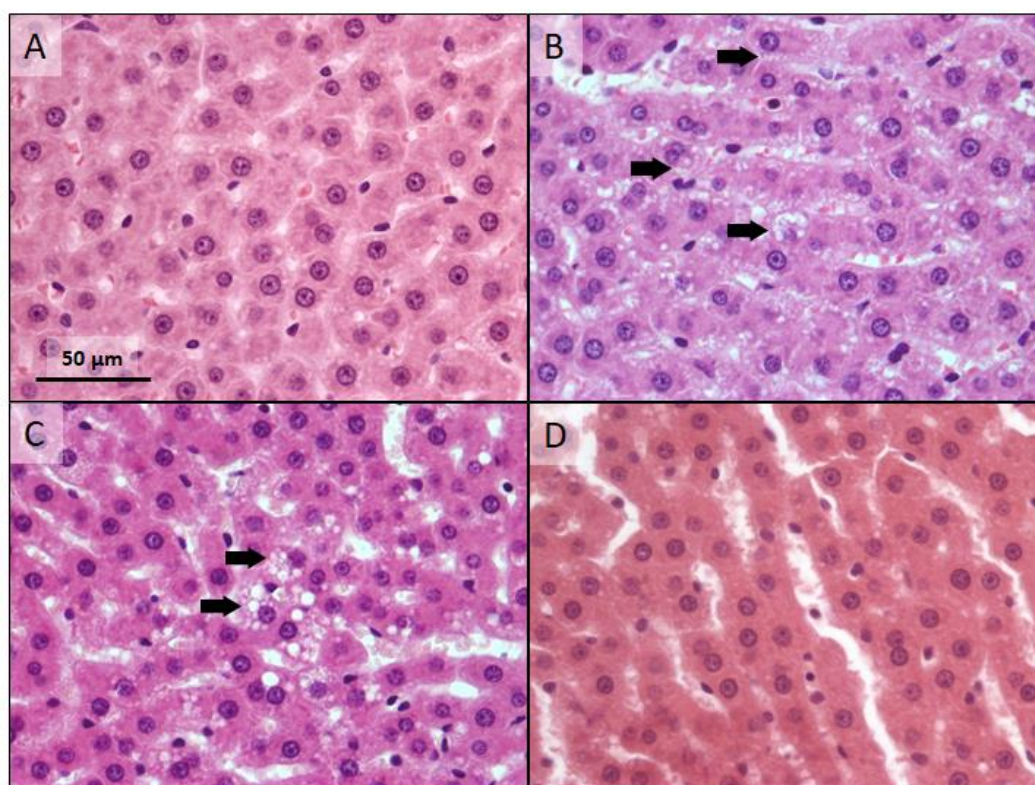
Uno de los principales riesgos asociados a la condición de obesidad y vinculado a la acumulación de grasa de tipo visceral, es el proceso de disfunción de los adipocitos, provocado por la hipertrofia o la expansión del tejido adiposo blanco. Este

proceso provoca el desarrollo de hipoxia en los adipocitos debido a que el flujo sanguíneo no permite la difusión del oxígeno circulante a las células, lo que desencadena finalmente el inicio de las rutas de apoptosis y de señalización inflamatoria en este tejido (Trayhurn *et al.*, 2008; Lafontan, 2014; Engin, 2017). Esta situación favorece el desarrollo de insulinoresistencia y limita la absorción de ácidos grasos al interior de los adipocitos, provocando la acumulación ectópica de lípidos. La reducción del peso relativo del tejido adiposo epididimal (Tabla 18) indica una reducción notable de los depósitos de tejido adiposo visceral en el grupo DGgH. Además, los resultados obtenidos en la Figura 37 confirman el desarrollo de hipertrofia en el tejido adiposo epididimal del grupo DGg. El consumo de hidrolizado de clara de huevo mejora la situación de hipertrofia en el tejido adiposo blanco en el grupo DGgH. Estos resultados sugieren que el hidrolizado de clara de huevo con pepsina podría estar induciendo las vías de adipogénesis mediante hiperplasia, lo que reduciría el riesgo de hipoxia y de desarrollo de inflamación en este grupo. En conjunto, los resultados observados en el tejido adiposo blanco indican una posible reducción del riesgo de desarrollar disfunción a largo plazo en este tejido y, en consecuencia, se produzca un riesgo menor de desarrollar síndrome metabólico en el grupo DGgH en comparación con el grupo que no consumió hidrolizado de clara de huevo.

Por otro lado, respecto al aumento no significativo en el peso relativo del hígado que se observó en el estudio anterior en el grupo DGg, cabe mencionar que el grupo DGgH mostró una disminución significativa del peso relativo de este órgano (Tabla 18). El ligero aumento observado en el peso del hígado del grupo DGg podría deberse a la acumulación ectópica de ácidos grasos en este órgano y podría estar relacionado con un posible desarrollo de HGNA, algo que ya observaron otros investigadores en otros modelos experimentales de obesidad (Kawasaki *et al.*, 2009; Garcés-Rimón *et al.*, 2016a). En la Figura 38 se presentan imágenes representativas de los cortes histológicos del hígado de los diferentes grupos experimentales al finalizar el estudio. En general, el grupo DGg mostró el desarrollo de liposomas, indicativos de la acumulación ectópica de lípidos en el tejido. Por otro lado, el grupo DGgH mostró una reducción visible de la acumulación lipídica en el hígado. Sin embargo, esta reducción

no fue total ya que varios de los cortes observados continuaron mostrando la aparición de liposomas. El grupo CH no mostró acumulación lipídica en los cortes observados.

Nuestros resultados muestran que el consumo de hidrolizado de clara de huevo con pepsina podría disminuir la acumulación de lípidos en el tejido hepático. En estudios previos, Garcés-Rimón *et al.* (2016b) también observaron que la administración de este mismo hidrolizado de clara de huevo disminuyó significativamente el desarrollo de esteatosis hepática en ratas Zucker, un modelo de obesidad genética caracterizada por una acumulación exacerbada de lípidos en el hígado y desarrollo de HGNA.



**Figura 38.** Imágenes tomadas en el microscopio óptico (objetivo 40x) de cortes de hígado teñidos con hematoxilina-eosina de los diferentes grupos experimentales al finalizar el estudio. Grupos experimentales: (Imagen A) Grupo control (C), (Imagen B) grupo de dieta grasa con glucosa (DGg), (Imagen C) grupo de dieta grasa con glucosa + 1 g/kg·día de hidrolizado (DGgH) y (Imagen D) grupo control + 1 g/kg·día de hidrolizado (CH). Se señala la formación de liposomas con flechas.

Los resultados obtenidos en este modelo experimental de DIO respecto a las ingestas y la composición corporal sugieren que el hidrolizado de clara de huevo con pepsina podría estar actuando sobre rutas relacionadas con la absorción y el

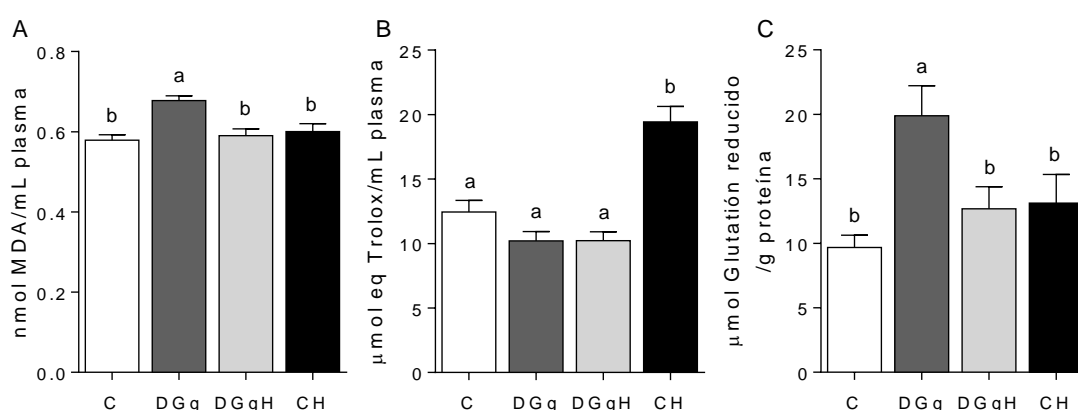
metabolismo de los ácidos grasos y/o los carbohidratos y, por lo tanto, su consumo podría ejercer un efecto preventivo sobre la acumulación de lípidos en otros tejidos como el hígado. En estudios realizados por otros grupos de investigación, se ha observado que algunos péptidos derivados de proteínas alimentarias pueden disminuir la absorción de ácidos grasos. Por ejemplo, péptidos derivados de proteínas de soja han demostrado inhibir la actividad de la enzima ácido graso sintasa (FAS) en experimentos *in vitro*, y se ha demostrado que estos péptidos son capaces de estimular la oxidación de ácidos grasos en ratones diabéticos (Udenigwe y Rouvinen-Watt, 2015). También otros hidrolizados y péptidos derivados de clara de huevo han demostrado disminuir la absorción de ácidos grasos a nivel intestinal inhibiendo su solubilización en micelas (Udenigwe y Rouvinen-Watt, 2015; Ochiai *et al.*, 2017). Sin embargo, parece poco probable que la disminución de la absorción de ácidos grasos sea el mecanismo de acción del hidrolizado de clara de huevo, ya que en estudios previos Garcés Rimón (2014), no observaron cambios en la cantidad de grasa en heces tras el consumo del hidrolizado de clara de huevo en ratas Zucker obesas.

#### **4.2.2. Efecto del consumo del hidrolizado de clara de huevo con pepsina sobre el desarrollo de estrés oxidativo e inflamación**

Debido al papel que el desarrollo de estrés oxidativo cumple en el establecimiento y mantenimiento del síndrome metabólico (Bonomini *et al.*, 2015), el consumo de alimentos antioxidantes se ha propuesto como una estrategia para reducir o limitar la aparición de complicaciones asociadas a esta patología (Andersen y Fernández, 2013). El hidrolizado de clara de huevo de este estudio y otros hidrolizados de clara de huevo con pepsina desarrollados en nuestro grupo de investigación con una composición similar de péptidos, han demostrado ejercer una elevada capacidad antioxidante tanto en estudios *in vitro* (Garcés-Rimón *et al.*, 2016b), como en diferentes modelos animales que habían desarrollado estrés oxidativo (Manso *et al.*, 2008; Garcés-Rimón *et al.*, 2016a; Rizzetti *et al.*, 2016a; Rizzetti *et al.*, 2016b; Rizzetti *et al.*, 2017b). Estas evidencias hacen necesario explorar esta vía de acción antioxidante

como posible mecanismo responsable de los efectos producidos por el hidrolizado de clara de huevo en este modelo experimental.

En la Figura 39 se representan los niveles plasmáticos de MDA y la capacidad antioxidante del plasma, así como los niveles de glutatión reducido en el hígado de los diferentes grupos animales al finalizar el estudio. El grupo DGg mostró niveles de MDA en plasma significativamente mayores respecto al grupo control (Figura 39A). El consumo de hidrolizado de clara de huevo consiguió disminuir estos valores en el grupo DGgH respecto al grupo DGg y los valores de MDA del grupo DGgH fueron además similares a los valores del grupo control. No se observaron diferencias significativas entre los grupos C y CH para estos valores. En cuanto a la capacidad antioxidante del plasma de los animales (Figura 39B), no se observaron diferencias significativas entre los grupos C, DGg y DGgH. Sin embargo, el grupo CH aumentó significativamente este parámetro al compararlo con el resto de grupos experimentales. En cuanto al glutatión, el grupo DGg aumentó significativamente los niveles de glutatión reducido en el hígado en comparación con el grupo control (Figura 39C). El grupo DGgH disminuyó significativamente estos valores respecto al grupo DGg y mostró valores similares a los del grupo control al final del estudio. No se observaron diferencias significativas para este parámetro al comparar los grupos C y CH.



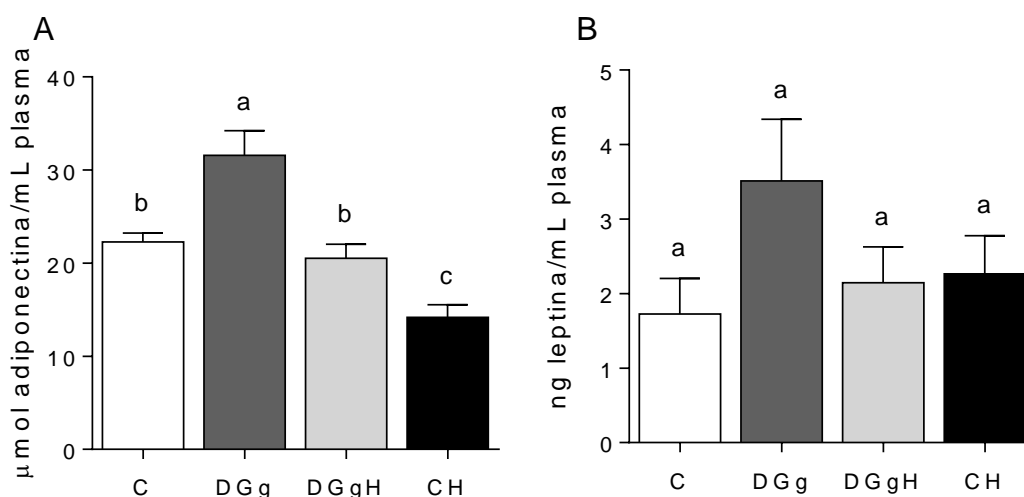
**Figura 39.** Evaluación de marcadores de estrés oxidativo en plasma e hígado. (A) Niveles de malondialdehído (MDA) en plasma, (B) capacidad antioxidante del plasma y (C) niveles de glutatión reducido en hígado al finalizar el periodo experimental del estudio. Grupos experimentales: Grupo control (C), grupo de dieta grasa con glucosa (DGg), grupo de dieta grasa con glucosa + 1 g/kg-día de hidrolizado (DGgH) y grupo control + 1 g/kg-día de hidrolizado (CH). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó el test t de Student para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores  $P < 0.05$ . Las letras diferentes representan la existencia de diferencias significativas entre grupos.

El MDA es un subproducto derivado de la peroxidación lipídica producida por EROs que se ha utilizado ampliamente en la literatura como marcador de estrés oxidativo (Ayala *et al.*, 2014). Los resultados observados en los niveles plasmáticos de MDA en el grupo DGgH confirman que el hidrolizado de clara de huevo de este estudio es capaz de reducir la peroxidación lipídica como ya se observó en estudios anteriores (Manso *et al.*, 2008; Garcés-Rimón *et al.*, 2016a; Rizzetti *et al.*, 2016a; Rizzetti *et al.*, 2016b; Rizzetti *et al.*, 2017b). Asimismo, si bien el grupo DGgH no mostró modificaciones significativas de la capacidad antioxidante del plasma, el grupo de animales que consumió una dieta estándar al que se administró hidrolizado de clara de huevo prácticamente dobló este parámetro respecto al resto de grupos experimentales. Esto sugiere que el consumo de hidrolizado de clara de huevo con pepsina podría favorecer el aumento de la defensa antioxidante en el plasma de sujetos sanos y ofrecer una protección extra frente a enfermedades relacionadas con el daño oxidativo. En cuanto a los resultados obtenidos en los valores de glutatión reducido en el hígado de los animales de los diferentes grupos experimentales, ya se comentó en el estudio anterior que el aumento de estos valores observados en el grupo DGg podría relacionarse con una respuesta compensatoria en el hígado como mecanismo de defensa ante un metabolismo oxidativo aumentado en este grupo. En el grupo DGgH no se observaron sin embargo, cambios en los niveles de glutatión reducido respecto al grupo control. Probablemente, en este grupo experimental la defensa antioxidante no tuvo que responder de la misma manera, ya que en este grupo no se observó un aumento de los niveles de peroxidación lipídica.

En conjunto, los resultados observados en los marcadores de estrés oxidativo analizados en este estudio indican que el hidrolizado de clara de huevo con pepsina podría ejercer un papel protector, no solo en sujetos que han desarrollado síndrome metabólico o alteraciones que impliquen la existencia de un daño oxidativo, sino que también proporcionaría un aumento de la defensa antioxidante en condiciones no patológicas. Este papel antioxidante del hidrolizado de clara de huevo podría resultar muy beneficioso ya que su consumo habitual podría suponer el disponer de una

defensa antioxidante inmediata frente a alteraciones oxidativas puntuales de desarrollo rápido.

Considerando que el modelo experimental de DIO seleccionado para evaluar el efecto del hidrolizado de clara de huevo había mostrado un aumento significativo de los niveles plasmáticos de adiponectina durante el estudio anterior, se propuso que el desarrollo de resistencia a esta adipocitoquina podría ser el mecanismo responsable de la adiponectinemia observada en este modelo experimental (Figura 29). En la Figura 40 se muestran los niveles plasmáticos de adiponectina y leptina de los grupos experimentales al finalizar este segundo estudio. En la figura se observa que en el grupo DGgH se redujo este parámetro de forma significativa respecto al grupo DGg, y se alcanzaron además valores similares a los del grupo control. El grupo CH mostró niveles de adiponectina significativamente menores al comparar estos valores con los del grupo control. Respecto a los niveles de leptina en plasma (Figura 40B), no se observaron cambios significativos en los valores de esta adipocitoquina en ningún grupo experimental.



**Figura 40.** Niveles plasmáticos de marcadores de adiposidad. (A) Niveles de adiponectina y (B) niveles de leptina en plasma al finalizar el periodo experimental del estudio. Grupos experimentales: Grupo control (C), grupo de dieta grasa con glucosa (DGg), grupo de dieta grasa con glucosa + 1 g/kg-día de hidrolizado (DGgH) y grupo control + 1 g/kg-día de hidrolizado (CH). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó el test t de Student para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores  $P < 0.05$ . Las letras diferentes representan la existencia de diferencias significativas entre grupos.

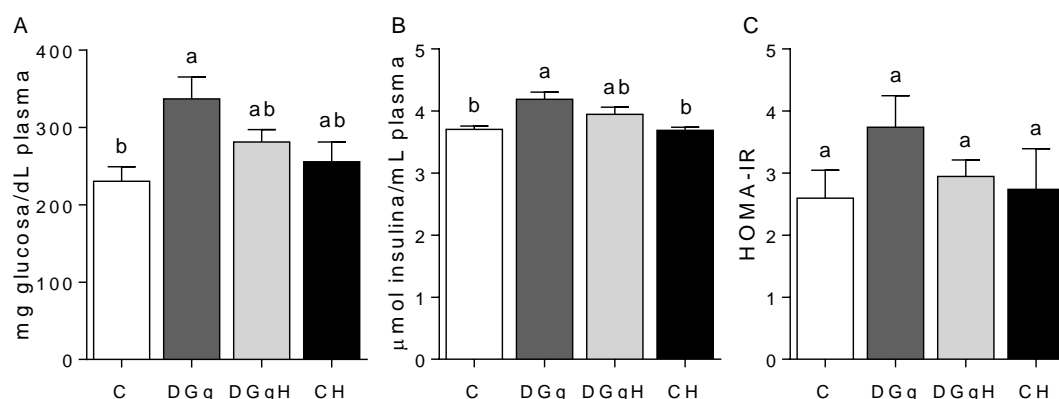


La normalización de los niveles de adiponectina en plasma observada en el grupo DGgH podría implicar la existencia de una sensibilización a adiponectina mediante el aumento de sus receptores en las membranas plasmáticas de otros tejidos. Por otra parte, también se observó una reducción en los niveles de adiponectina plasmáticos en el grupo CH en comparación con el grupo control. Garcés-Rimón *et al.* (2016a), también observaron un aumento de los niveles plasmáticos de adiponectina en ratas Zucker obesas que se revirtió de forma significativa tras el consumo del hidrolizado de clara de huevo con pepsina. El resultado obtenido en el grupo CH podría reflejar una mayor sensibilización a adiponectina en el grupo control que consumió hidrolizado de clara de huevo, lo que llevaría a reducir sus niveles en plasma. Respecto a los niveles de leptina observados en este estudio, si bien no se observaron cambios significativos entre grupos, hay que señalar que el grupo DGg mostró una clara tendencia al incremento de este parámetro. Si esto fuera así, el grupo DGg tendría aumentada la respuesta inflamatoria ocasionada por la acumulación de leptina en el plasma, y lo más importante, el consumo de hidrolizado de clara de huevo mejoraría esta situación y, en consecuencia, el desarrollo de síndrome metabólico.

Los resultados observados en los marcadores de desarrollo de estrés oxidativo e inflamación sugieren que el hidrolizado de clara de huevo con pepsina podría estar ejerciendo un papel protector, especialmente sobre el desarrollo de estrés oxidativo. La mejoría observada sobre esta condición podría encontrarse relacionada con los resultados obtenidos en el tejido adiposo epididimal, y es que la reducción de la hipertrofia de los adipocitos mejoraría la capacidad de este tejido para acumular ácidos grasos en su interior, lo cual reduciría también el metabolismo oxidativo en este tejido. En cuanto a los resultados observados en los marcadores de adiposidad e inflamación (adiponectina y leptina), aunque se ha demostrado una tendencia en la mejora de estos parámetros, sería necesario realizar más estudios para obtener resultados más contundentes, que permitan discutir en profundidad los cambios observados especialmente en los niveles plasmáticos de adiponectina.

#### **4.2.3. Efecto del consumo del hidrolizado de clara de huevo con pepsina sobre el metabolismo de la glucosa**

El desarrollo de insulinoresistencia es uno de los principales factores de riesgo que caracterizan el síndrome metabólico, y se incluye de forma habitual como uno de los factores para el diagnóstico de esta patología (International Diabetes Federation, 2006; Aydin *et al.*, 2014). En la Figura 41 se muestran los niveles de glucosa e insulina en plasma, así como los valores del índice HOMA-IR en todos los grupos experimentales al finalizar el estudio. El grupo DGg mostró un aumento significativo de los niveles de glucosa en plasma respecto al grupo control (Figura 41A). El grupo DGgH redujo ligeramente los niveles de glucosa en plasma que habían aumentado de forma significativa en el grupo DGg aunque no se obtuvieron diferencias significativas al comparar los niveles plasmáticos de glucosa del grupo DGgH con los de los grupos C o DGg. No se observaron diferencias significativas en los valores de glucosa plasmática entre los grupos C y CH. En cuanto a los niveles de insulina en plasma (Figura 41B), el grupo DGg aumentó significativamente estos valores respecto al grupo control, y el grupo DGgH redujo ligeramente estos valores, de modo que no se obtuvieron diferencias significativas al comparar los niveles plasmáticos de insulina del grupo DGgH con los de los grupos C y DGg. No se observaron diferencias significativas en los niveles de insulina entre los grupos C y CH. Los resultados de HOMA-IR no mostraron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales (Figura 41C).

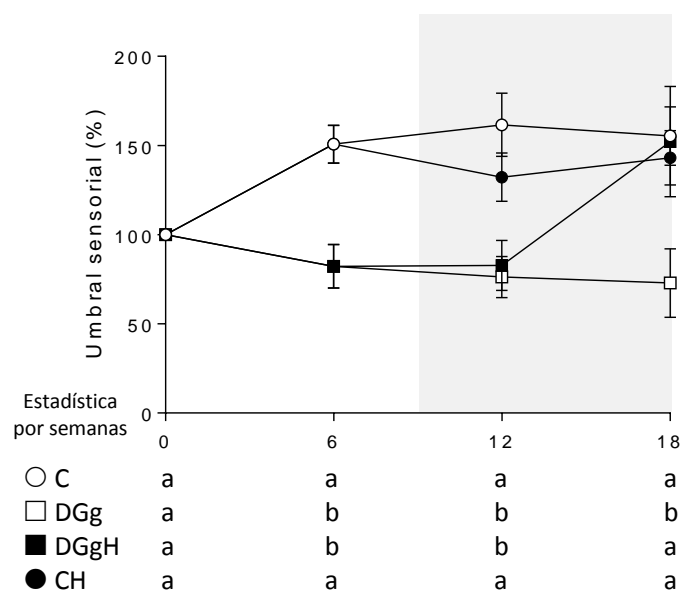


**Figura 41.** Niveles en plasma de (A) glucosa y (B) insulina y (C) cálculo del índice de resistencia a insulina (HOMA-IR) de todos los grupos al finalizar el periodo experimental. Grupos experimentales: Grupo control (C), grupo de dieta grasa con glucosa (DGg), grupo de dieta grasa con glucosa + 1 g/kg-día de hidrolizado (DGgH) y grupo control + 1 g/kg-día de hidrolizado (CH). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó el test t de Student para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores  $P < 0.05$ . Las letras diferentes representan la existencia de diferencias significativas entre grupos.

Aunque no se observaron diferencias significativas, el grupo DGgH mostró una ligera reducción de los niveles de glucosa en plasma con respecto al grupo DGg al finalizar el segundo estudio. Se observó un resultado similar respecto a los niveles de insulina en plasma en esos grupos experimentales. Es importante considerar que, si bien los niveles de glucosa e insulina en el plasma de los animales del grupo DGg aumentaron significativamente respecto al grupo control, no se observaron diferencias tras calcular los valores de HOMA-IR, y por lo tanto no se observó desarrollo de insulinoresistencia en este grupo de animales. En este sentido, no podemos confirmar que el grupo DGg pueda considerarse un modelo de insulinoresistencia. Para poder justificar los beneficios que podría producir la administración del hidrolizado de clara de huevo con pepsina sobre el metabolismo de la glucosa y la insulina, éstos deberían evaluarse sobre un modelo experimental de insulinoresistencia más adecuado.

Debido a la importancia del desarrollo de neuropatía periférica como marcador de riesgo del desarrollo de insulinoresistencia y DM2, y teniendo en cuenta las alteraciones observadas en el metabolismo de la glucosa en este modelo experimental y su relación con la aparición de prediabetes y neuropatía sensorial, consideramos de gran importancia evaluar el efecto que produce la administración del hidrolizado de clara de huevo con pepsina sobre el desarrollo de neuropatía periférica mediante la

evaluación del desarrollo de alodinia táctil o hipersensibilidad mediante la técnica de filamentos de Von Frey. Estos resultados se encuentran representados en la Figura 42. Los dos grupos experimentales que consumieron una dieta hipergrasa con glucosa (DGg y DGgH) experimentaron una reducción significativa de su umbral sensorial durante las primeras semanas del estudio comparado con los animales del grupo control. Sin embargo, a partir de la semana 12 (primera evaluación desde el inicio del tratamiento con hidrolizado de clara de huevo), el grupo DGgH experimentó una tendencia a aumentar su umbral sensorial, que se hizo significativo en la semana 18 del estudio. Este resultado indica el potencial efecto preventivo del hidrolizado de clara de huevo sobre el desarrollo de DM2 a largo plazo. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Garcés-Rimón *et al.* (2018), quienes también observaron una mejora significativa del umbral sensorial en ratas Zucker obesas tras el consumo de hidrolizado de clara de huevo con pepsina.



**Figura 42.** Evolución del umbral sensorial en los diferentes grupos experimentales a lo largo del periodo experimental con respecto a la semana inicial del estudio. Grupos experimentales: Grupo control (C, ○), grupo de dieta grasa con glucosa (DGg, □), grupo de dieta grasa con glucosa + 1 g/kg-día de hidrolizado (DGgH, ■) y grupo control + 1 g/kg-día de hidrolizado (CH, ●). El tratamiento con hidrolizado de clara de huevo comenzó a partir de la semana 9 del estudio. Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó un análisis de varianza de dos vías seguido del test de Bonferroni para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores  $P < 0.05$ . Las letras diferentes representan la existencia de diferencias significativas entre grupos.

Estos resultados ponen de manifiesto que el consumo del hidrolizado de clara de huevo con pepsina podría ser de gran utilidad en la prevención y desarrollo de DM2 y algunas de sus patologías asociadas, como es la neuropatía periférica. Debido a que el modelo experimental de síndrome metabólico utilizado en este estudio no mostró un aumento notable de los niveles de insulina, no fue posible evaluar la actividad hipoinsulinémica de este hidrolizado durante este estudio. Sin embargo, estos resultados complementan los obtenidos por Garcés-Rimón *et al.* (2018), ya que en su estudio el modelo experimental de obesidad empleado sí presentó una alteración muy significativa de los niveles de insulina en plasma y mostró un claro desarrollo de insulinoresistencia, lo cual permitió observar una actividad hipoinsulinémica significativa tras el consumo del hidrolizado de clara de huevo con pepsina. Sin embargo, en el estudio de Garcés-Rimón *et al.*, no se observaron cambios en los niveles de glucosa en plasma debido al carácter normoglucémico del modelo de rata Zucker obesa. Nuestros resultados, junto con los obtenidos por Garcés-Rimón *et al.* (2018), muestran el potencial efecto del hidrolizado de clara de huevo con pepsina sobre las alteraciones del metabolismo de la glucosa.

#### **4.2.4. Efecto del consumo del hidrolizado de clara de huevo con pepsina sobre el metabolismo lipídico**

Los resultados observados en el metabolismo de la glucosa y sensibilización a insulina sugieren que el hidrolizado de clara de huevo podría estar causando una sensibilización a esta hormona. Esto podría ocasionar una respuesta mayor por parte del tejido adiposo blanco para captar los ácidos grasos circulantes y, de este modo, disminuir la acumulación ectópica de lípidos en otros órganos no especializados. En el estudio anterior de esta Tesis Doctoral, el modelo experimental que recibió una dieta hipergrasa con glucosa experimentó un aumento significativo de los TG plasmáticos, así como una ligera reducción, no significativa, del colesterol HDL.

En la Tabla 19 se muestran los resultados obtenidos tras analizar los niveles plasmáticos de TG, colesterol total y colesterol HDL, así como el índice aterogénico de todos los grupos experimentales al finalizar el estudio. Los grupos DGg y DGgH mostraron un aumento significativo de los niveles plasmáticos de TG al finalizar el estudio. No se observaron diferencias significativas de estos valores entre los grupos C y CH. En cuanto a los niveles de colesterol total, no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales. Los grupos DGg y DGgH no modificaron significativamente sus niveles plasmáticos de colesterol HDL respecto al grupo control. El grupo CH aumentó significativamente este parámetro al compararlo con el grupo control. En cuanto a los resultados del índice aterogénico, ninguno de los grupos experimentales mostró diferencias significativas al comparar este índice con el del grupo control. Sin embargo, el grupo CH mostró un índice aterogénico significativamente menor al de los grupos DGg y DGgH.

**Tabla 19.** Evaluación de los niveles de diferentes marcadores de metabolismo lipídico en plasma al finalizar el estudio. Grupos experimentales: Grupo control (C), grupo de dieta grasa con glucosa (DGg), grupo de dieta grasa con glucosa + 1 g/kg·día de hidrolizado (DGgH) y grupo control + 1 g/kg·día de hidrolizado (CH). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó el test t de Student para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores  $P < 0.05$ . Las letras diferentes representan la existencia de diferencias significativas entre grupos.

Marcadores de metabolismo lipídico (n $\geq$ 6)				
	C	DGg	DGgH	CH
Triglicéridos (mg/dL)	39.00 $\pm$ 2.07 <sup>a</sup>	59.83 $\pm$ 7.15 <sup>bc</sup>	66.78 $\pm$ 3.67 <sup>b</sup>	44.50 $\pm$ 3.03 <sup>ac</sup>
Colesterol total (mg/dL)	54.17 $\pm$ 4.00 <sup>a</sup>	51.75 $\pm$ 2.84 <sup>a</sup>	57.10 $\pm$ 2.72 <sup>a</sup>	53.60 $\pm$ 1.33 <sup>a</sup>
Colesterol HDL (mg/dL)	10.00 $\pm$ 0.99 <sup>a</sup>	7.97 $\pm$ 1.41 <sup>a</sup>	10.23 $\pm$ 1.19 <sup>a</sup>	13.09 $\pm$ 0.38 <sup>b</sup>
Índice aterogénico (CT/HDL)	5.84 $\pm$ 0.97 <sup>ab</sup>	7.03 $\pm$ 1.06 <sup>a</sup>	6.24 $\pm$ 0.66 <sup>a</sup>	4.14 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>

El hidrolizado de clara de huevo con pepsina administrado durante este estudio había mostrado ejercer actividad hipocolesterolemica tanto *in vitro* (Garcés-Rimón *et al.*, 2016b) como *in vivo* en el modelo de rata Zucker obesa (Garcés-Rimón *et al.*, 2016a). Sin embargo, en esta Tesis Doctoral no se observaron modificaciones significativas en los niveles de TG ni de colesterol en el grupo de animales obesos que

consumió hidrolizado (DGgH) respecto al grupo de animales obesos que no consumió hidrolizado (DGg). El consumo de hidrolizado de clara de huevo con pepsina sí pareció revertir la ligera disminución de los niveles de colesterol HDL observada en el grupo DGg. Es importante mencionar que se observó un aumento significativo del colesterol HDL en el grupo CH con respecto al resto de grupos experimentales. Este resultado podría relacionarse con el aumento observado también en este mismo grupo (CH) en la capacidad antioxidante del plasma. Esto puede relacionarse con el hecho de que la molécula de colesterol HDL forma parte del sistema de defensa antioxidante, que evita la oxidación de las LDL en el plasma. Este hecho nos hace pensar que uno de los mecanismos por los cuales el hidrolizado de clara de huevo con pepsina podría aumentar la defensa antioxidante del plasma y reducir el estrés oxidativo, derivado o no de la condición de obesidad, podría ser a través de la estimulación y del aumento de colesterol HDL circulante.

Hasta la fecha, se han descrito una gran variedad de péptidos e hidrolizados derivados de proteínas alimentarias que han mostrado ejercer una actividad beneficiosa sobre diversas alteraciones englobadas en la definición del síndrome metabólico (Eckert *et al.*, 2013). La mayor parte de la investigación realizada hasta el día de hoy sobre péptidos bioactivos derivados de la clara de huevo recoge estudios *in vitro*, y solo existe un pequeño porcentaje de estudios *in vivo* en animales de experimentación (Iwaniak *et al.*, 2018). Además la mayoría de los estudios en que se analiza la actividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias habitualmente se centran en determinar una actividad biológica específica, y los estudios en que se evalúan varias actividades biológicas de forma simultánea son escasos (Iwaniak *et al.*, 2018).

El presente estudio demuestra el potencial multifuncional *in vivo* del hidrolizado de clara de huevo evaluado sobre un modelo animal de DIO al que se administró una dieta hipergrasa y una solución de glucosa al 25% durante 20 semanas. El hidrolizado de clara de huevo con pepsina ha demostrado capacidad para reducir el peso corporal y la acumulación lipídica. Además, ha conseguido reducir los marcadores de estrés oxidativo y de adiposidad, así como mejorar ligeramente los niveles de glucosa e insulina en plasma y evitar el desarrollo de neuropatía periférica.

En resumen, los resultados obtenidos durante el segundo estudio de esta Tesis Doctoral sugieren que la administración del hidrolizado de clara de huevo con pepsina podría utilizarse como alimento funcional para mejorar algunas de las complicaciones asociadas al síndrome metabólico, provocado en la mayoría de los casos, por la ingesta habitual de dietas poco saludables. Para alcanzar este propósito, sin embargo, son necesarios más estudios que permitan determinar en profundidad los mecanismos de acción implicados en la actividad biológica del hidrolizado. Además, para la comercialización del hidrolizado es necesario evaluar el efecto del consumo del hidrolizado de clara de huevo con pepsina, así como estudiar la posible aparición de efectos secundarios, tanto en voluntarios sanos como en voluntarios con sobrepeso y/o síndrome metabólico.

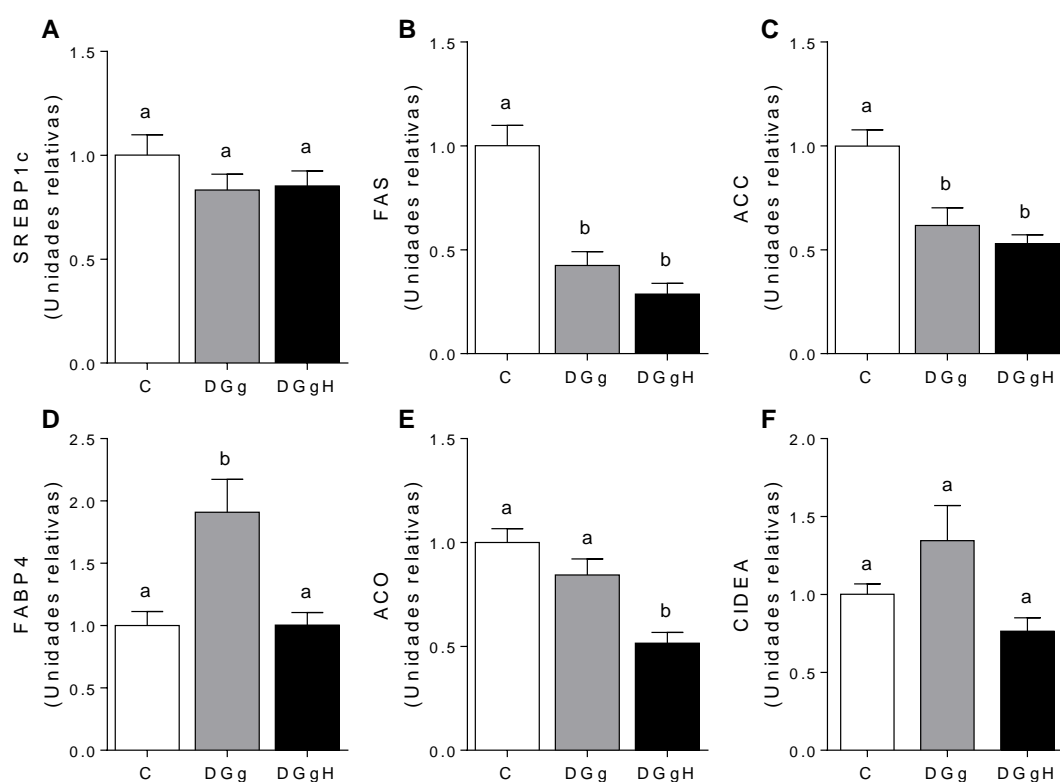
#### **4.2.5. Efecto del hidrolizado de clara de huevo sobre tejidos implicados en el metabolismo energético. Análisis de la expresión de genes mediante RT-qPCR**

Teniendo en cuenta la importancia que la disfunción del tejido adiposo adquiere en el desarrollo de síndrome metabólico, y basándonos en los resultados observados en los estudios llevados a cabo esta Tesis Doctoral, se decidió investigar en profundidad el efecto que ocasiona el consumo del hidrolizado de clara de huevo en algunos de los tejidos implicados en el metabolismo energético: tejido adiposo epididimal, tejido adiposo pardo y tejido muscular. Para ello se cuantificó, mediante RT-qPCR, la expresión de genes implicados en rutas metabólicas relacionadas con la acumulación y el gasto energético. En primer lugar, se presentarán y discutirán los resultados obtenidos en el tejido adiposo epididimal, y posteriormente los resultados en el tejido adiposo pardo y en el tejido muscular.

En la Figura 43 se representa la expresión génica de algunos genes implicados en la síntesis, oxidación y movilización de ácidos grasos en el tejido adiposo epididimal. No se observaron diferencias significativas entre grupos en la expresión del gen SREBP1c. Los grupos DGg y DGgH mostraron una reducción significativa de la expresión de los genes FAS y ACC respecto al grupo control, y no se observaron diferencias



significativas en la expresión de estos genes entre los grupos DGg y DGgH. En cuanto a la expresión del gen FABP4, el grupo DGg aumentó significativamente este parámetro respecto al grupo control y el grupo DGgH redujo significativamente estos valores respecto al grupo DGg y alcanzó valores similares a los del grupo control. No se observaron diferencias significativas en la expresión del gen ACO al comparar los grupos DGg y C, pero el grupo DGgH redujo significativamente la expresión del gen ACO al comparar estos valores con los de los grupos C y DGg. En cuanto al gen CIDEA, no se observaron diferencias significativas entre grupos experimentales en la expresión de este gen.



**Figura 43.** Expresión de genes implicados en la síntesis, oxidación y movilización de ácidos grasos en el tejido adiposo epididimal de varios grupos experimentales al finalizar el periodo experimental. (A) Proteína de unión al regulador de esterol 1c (SREBP1c); (B) Ácido graso sintasa (FAS); (C) Acetil CoA carboxilasa (ACC); (D) Proteína transportadora de ácidos grasos (FABP4); (E) Acetil CoA oxidasa (ACO); (F) Activador de muerte celular CIDE-A (CIDEA). Grupos experimentales: Grupo control (C), grupo de dieta grasa con glucosa (DGg) y grupo de dieta grasa con glucosa + 1 g/kg-día de hidrolizado (DGgH). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó el test de Mann-Whitney para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores  $P < 0.05$ . Las letras diferentes representan la existencia de diferencias significativas entre grupos.

Aunque no se observaron diferencias significativas en la expresión del gen SERBP1c, principal regulador de acumulación lipídica y lipogénesis, sí se observó una reducción significativa en la expresión de genes implicados en la síntesis *de novo* de ácidos grasos: FAS y ACC, en los grupos DGg y DGgH con respecto al grupo control. Teniendo en cuenta la relación inversa que existe entre los niveles de TG plasmáticos y la expresión y actividad de la enzima FAS (Mayas *et al.*, 2009; Mayas *et al.*, 2010), el resultado observado en la expresión de esta enzima coincide con los resultados observados a nivel sistémico, ya que no se observó una reducción significativa de los TG en el plasma de los animales del grupo DGgH respecto al grupo DGg (Tabla 19). Por otro lado, aunque el peso relativo del tejido adiposo epididimal del grupo DGgH disminuyó de forma significativa respecto al peso relativo de este tejido observado en el grupo DGg, no alcanzó los valores del grupo control (Tabla 18). Es por este motivo que las vías de síntesis de ácidos grasos en este tejido puedan encontrarse aún inhibidas en el grupo DGgH, aun a pesar de haber consumido hidrolizado de clara de huevo y haberse observado en este grupo mejoras significativas en la condición de síndrome metabólico.

Cabe destacar, que el hidrolizado de clara de huevo normalizó la expresión del gen FABP4, que se encontraba significativamente estimulado en el grupo DGg (Figura 43). Teniendo en cuenta que la proteína transportadora de ácidos grasos 4, codificada por el gen FABP4, se considera una adipocitoquina marcadora de riesgo de padecer síndrome metabólico, su normalización tras el consumo de hidrolizado de clara de huevo sugiere que el grupo DGgH podría disminuir el riesgo de desarrollar esta patología (Xu *et al.*, 2006; Kralisch y Fasshauer, 2013; Furuhashi *et al.*, 2014). Por otra parte, aunque no se observaron diferencias significativas, el gen ACO presentó una expresión ligeramente menor en el grupo DGg con respecto al grupo control. Sin embargo, el grupo DGgH sí experimentó una reducción significativa de la expresión de este gen. Los peroxisomas son orgánulos de acceso rápido implicados en múltiples rutas metabólicas. Entre ellas, la oxidación de ácidos grasos de cadena larga y ácidos grasos poliinsaturados compone una de sus principales funciones, siendo la enzima acetil CoA oxidasa, codificada por el gen ACO, la primera enzima implicada en este proceso (Dansen y Wirtz, 2001). En los últimos años, se ha relacionado el aumento de

la actividad de la enzima ACO y la proliferación de peroxisomas con un aumento del estrés oxidativo celular (Dansen y Wirth, 2001; Zeng *et al.*, 2017). Por este motivo, consideramos que la menor expresión de la enzima ACO en el tejido adiposo epididimal del grupo DGgH podría indicar una tendencia a reducir el estrés oxidativo en este tejido. Además, la menor oxidación de ácidos grasos en las condiciones en las que se encontraba este grupo (administración continuada de ácidos grasos y azúcares), podría también apuntar una mayor sensibilidad a la insulina en el tejido adiposo del grupo DGgH. Esta situación derivaría en una mayor acumulación de lípidos en este tejido y, en consecuencia, una menor liberación de ácidos grasos al torrente sanguíneo, lo que evitaría la acumulación ectópica de lípidos en otros tejidos.

El gen CIDEA se considera un marcador de tejido adiposo pardo, y se encuentra implicado en la regulación de la fusión de las gotas lipídicas, la lipólisis y termogénesis en este tejido (Nishimoto *et al.*, 2017; Nishimoto y Tamori, 2017). Se considera por ello a este gen como un marcador del pardeamiento del tejido adiposo blanco (Wu *et al.*, 2018), aunque también se ha observado que este gen podría estar implicado en la expansión del tejido adiposo blanco, mediando la fusión de las gotas lipídicas e induciendo hipertrofia en los adipocitos blancos (Wu *et al.*, 2014). En la Figura 43 se observa que aunque no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales respecto a la expresión del gen CIDEA, el grupo DGg mostró un ligero aumento de la expresión de este gen. Este ligero aumento no ocurrió, sin embargo, en el grupo DGgH. En el primer estudio realizado en esta Tesis Doctoral se postuló la posible inducción de termogénesis inducida por dieta en los grupos experimentales de DIO. La aparición de este fenómeno y su mantenimiento a lo largo del tiempo supone un aumento exacerbado del metabolismo oxidativo en un tejido poco especializado como es el tejido adiposo blanco. Esto supone una producción excesiva de EROs que, en última instancia, dañan las estructuras mitocondriales y causan disfunción mitocondrial y estrés oxidativo (Jankovic *et al.*, 2015; Castro *et al.*, 2016; Bhatti *et al.*, 2017; Scheele y Nielsen, 2017). Los resultados observados en el grupo DGg respecto a la expresión del gen CIDEA podrían indicar la inducción de termogénesis en el tejido adiposo epididimal, que actuaría como un mecanismo compensatorio a la administración de una dieta alta en grasas y azúcares. Por otro

lado, podría inducir la estimulación del crecimiento de los adipocitos mediante hipertrofia, como mecanismo para aumentar la capacidad de almacenaje en este tejido. Los resultados mostraron que el consumo de hidrolizado de clara de huevo parece detener esta alteración, y mantiene la expresión del gen CIDEA en valores similares a los que se observan en el grupo control.

En la Tabla 20 figura la expresión génica de algunos marcadores de adiposidad, insulinoresistencia y estrés oxidativo en el tejido adiposo epididimal al finalizar el periodo experimental. No se observaron diferencias significativas entre grupos para la expresión de los genes de leptina y del receptor de leptina. Los grupos DGg y DGgH presentaron una expresión significativamente menor de los genes de adiponectina y PPAR $\alpha$  respecto al grupo control. No se observaron diferencias significativas en la expresión del gen de resistina entre los grupos DGg y C. El grupo DGgH mostró una expresión de resistina significativamente menor en comparación con los grupos C y DGg. En cuanto al receptor de insulina, los grupos DGg y DGgH mostraron una expresión significativamente menor de este gen respecto al grupo control; no se observaron diferencias significativas para este parámetro entre los grupos DGg y DGgH. El grupo DGg mostró una expresión significativamente menor de GPX3 respecto al grupo control. El grupo DGgH aumentó ligeramente la expresión de este gen, de modo que no se observaron diferencias significativas al comparar estos valores con los obtenidos para los grupos DGg y control. Respecto al gen iNOS, no se observaron diferencias significativas al comparar los grupos DGg y DGgH con el grupo control, y el grupo DGgH aumentó significativamente la expresión de este gen respecto al grupo DGg.

**Tabla 20.** Expresión génica de marcadores de adiposidad, insulinoresistencia y estrés oxidativo el tejido adiposo epididimal de varios grupos experimentales al finalizar el periodo experimental. Grupos experimentales: Grupo control (C), grupo de dieta grasa con glucosa (DGg) y grupo de dieta grasa con glucosa + 1 g/kg-día de hidrolizado (DGgH). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó el test de Mann-Whitney para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores  $P < 0.05$ . Las letras diferentes representan la existencia de diferencias significativas entre grupos. PPAR $\alpha$ : Receptor activado de proliferadores de peroxisomas alfa; GPX3: Glutación peroxidasa 3; iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible.

	Gen (n $\geq$ 6)	Grupo experimental		
		C	DGg	DGgH
Marcadores de adiposidad	Leptina	1.00 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.76 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.63 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>
	Receptor de Leptina	1.00 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	0.98 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	1.08 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
	Adiponectina	1.00 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.53 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	0.41 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>
Marcadores de insulinoresistencia	PPAR $\alpha$	1.00 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.42 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.34 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>
	Resistina	1.00 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	0.79 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	0.47 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>
	Receptor de Insulina	1.00 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.60 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.77 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>
Marcadores de estrés oxidativo	GPX3	1.00 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.61 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	0.81 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup>
	iNOS	1.00 $\pm$ 0.15 <sup>ab</sup>	0.83 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	1.23 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>

En referencia a la expresión génica de los marcadores de adiposidad evaluados en el tejido adiposo epididimal, los resultados observados en la expresión génica de la leptina y de su receptor concuerdan con los obtenidos al evaluar las concentraciones plasmáticas de esta adipocitoquina, ya que tampoco se observaron diferencias significativas para estos valores (Figura 40). Respecto a la expresión génica de adiponectina, ya se mencionó que la adiponectinemia observada en el grupo DGg podría deberse al desarrollo de resistencia a esta adipocitoquina mediada por una reducción de sus receptores en otros tejidos. La normalización de los niveles plasmáticos de adiponectina observados en el grupo DGgH (Figura 40) sugirió la posible sensibilización a la adiponectina en este grupo experimental. Los resultados de la Tabla 20 muestran una reducción significativa de la expresión del gen de adiponectina en el grupo DGg que no se normalizó en el grupo DGgH. Considerando que la expresión génica de adiponectina en el tejido adiposo epididimal no se modificó en el grupo DGgH respecto al grupo DGg, podríamos suponer que la normalización de los niveles plasmáticos de adiponectina observados anteriormente pueden deberse efectivamente a una mayor sensibilización tisular a esta adipocitoquina. Sin embargo, para confirmar esta hipótesis sería necesario evaluar la expresión de sus receptores en

otros tejidos y/o cuantificar estos receptores en las membranas plasmáticas de otros tejidos.

Respecto a los genes implicados en el desarrollo de insulinoresistencia, los resultados del segundo estudio de esta Tesis Doctoral mostraron que el hidrolizado de clara de huevo con pepsina podría favorecer la sensibilización a la insulina en el tejido adiposo epididimal (Figura 41, Figura 42). Los resultados observados en la Tabla 20 mostraron una expresión significativamente menor del gen PPAR $\alpha$  respecto al grupo control. La menor expresión de este gen se encuentra directamente relacionada con el desarrollo de insulinoresistencia en el tejido adiposo epididimal y podría estar implicado por tanto, en el desarrollo de DM2 a largo plazo (Rakhshandehroo *et al.*, 2010). Sin embargo, a pesar de que el consumo de hidrolizado mostró reducir los niveles de glucosa e insulina plasmáticos de forma parcial en el grupo DGgH, este grupo no mostró modificaciones significativas de la expresión del gen PPAR $\alpha$  ni del gen del receptor de insulina respecto al grupo DGg. Por otro lado, sí se observó una reducción significativa en la expresión de resistina en el tejido adiposo epididimal del grupo DGgH respecto a los grupos C y DGg. Esta adipocitoquina se encuentra directamente relacionada con el desarrollo de insulinoresistencia en roedores (Huang y Yang, 2016), y podría estar implicada en los resultados observados a nivel fisiológico (Figura 41, Figura 42).

En cuanto a los marcadores de estrés oxidativo, se observó una menor expresión del gen GPX3, que codifica para la enzima glutatión peroxidasa 3. Esta enzima, implicada en la reacción de oxidación del glutatión reducido con el objetivo de eliminar las EROs en el medio celular (Brigelius-Flohé y Maiorino, 2013), se encontró menos expresada en el grupo DGg, mostrando una menor capacidad para eliminar EROs. Este resultado coincide con los obtenidos por otros investigadores, quienes observaron una reducción significativa de la expresión del gen GPX3 en ratones obesos, así como una menor actividad de la enzima glutatión peroxidasa 3 en individuos obesos (Brigelius-Flohé y Maiorino, 2013). Aunque no se observaron diferencias significativas entre el grupo DGg y el grupo DGgH, el consumo de hidrolizado de clara de huevo con pepsina aumentó ligeramente la expresión de GPX3 en el grupo DGgH. Estos resultados coinciden con la mejora del estado oxidativo que

se produjo en el grupo DGgH, en el que se observó una reducción de los marcadores de estrés oxidativo en plasma (disminución de MDA y aumento de capacidad antioxidante), sin modificaciones en los niveles de glutatión reducido en el hígado de este grupo de animales. Por otro lado, se observó un aumento significativo de la expresión de iNOS en el grupo DGgH cuando estos valores de expresión se compararon con los del grupo DGg. Hasta la fecha, se ha considerado la activación de la enzima iNOS como una respuesta ante estados inflamación y de estrés, que contribuía además al empeoramiento de estas alteraciones. Sin embargo, Lind *et al.* (2017) realizaron un artículo de revisión en que se cuestionó el efecto perjudicial de esta enzima, sugiriendo que la activación de iNOS podría representar un papel protector que permitiera mantener la producción de óxido nítrico (NO), ante la ausencia de otras enzimas constitutivas, como la óxido nítrico sintasa (NOS) endotelial o la NOS neuronal. De hecho, la disfunción del tejido adiposo perivascular producida en individuos obesos se encuentra fuertemente relacionada con la ausencia de NO y la menor vasodilatación que esto conlleva. Este fenómeno tiene como consecuencia el desarrollo de hipertensión (Xia *et al.*, 2017). Además, el NO estimula las vías de señalización de angiogénesis y vasodilatación durante eventos de hipoxia, como los que ocurren en el tejido adiposo visceral durante el desarrollo de obesidad (Kane *et al.*, 2001), y favorece la diferenciación de adipocitos en el tejido adiposo (Wang y Hai, 2015). El resultado observado en el grupo DGgH, que muestra aumento de la expresión de la enzima iNOS, podría reflejar la activación de las vías de diferenciación y maduración de adipocitos que, combinadas con la estimulación de las rutas de angiogénesis, permitirían la vascularización del tejido adiposo que se encuentra en expansión en este grupo. Sin embargo, y aunque las rutas que regulan estos procesos son complejas y sería necesario llevar a cabo otros estudios para confirmar esta hipótesis, es importante mencionar que tanto el hidrolizado de clara de huevo administrado en este estudio como algunos péptidos derivados de él ya habían demostrado ejercer actividad vasodilatadora mediante la producción de NO en estudios anteriores realizados por nuestro grupo de investigación (Miguel *et al.*, 2007a; Rizzetti *et al.*, 2017a).

En conjunto, los resultados obtenidos tras evaluar la expresión de genes en el tejido adiposo epididimal han demostrado que el consumo del hidrolizado de clara de huevo es capaz de modular la expresión de genes que podrían estar implicados en la mejoría observada sobre el desarrollo del síndrome metabólico en los animales tratados con este producto. Sin embargo, los resultados obtenidos en el tejido adiposo blanco no nos permiten esclarecer el mecanismo de acción del hidrolizado de clara de huevo con pepsina. Cabe la posibilidad de que el hidrolizado pudiera estar ejerciendo su acción principal en otro tejido diana y, en consecuencia, producir algún beneficio sobre el tejido adiposo blanco.

Como hemos comentado anteriormente, en este estudio se observó una normalización del peso corporal y del perímetro abdominal de los animales que consumieron una dieta grasa con glucosa junto con el hidrolizado de clara de huevo, incluso a pesar del aumento significativo observado en la ingesta calórica de este grupo de animales desde el inicio del tratamiento. Estos resultados sugieren que el hidrolizado de clara de huevo con pepsina podría estimular otras rutas metabólicas relacionadas con el gasto energético. Hasta la fecha, se han descrito una gran cantidad de componentes derivados de los alimentos, entre ellos péptidos e hidrolizados proteicos, que han demostrado inducir el gasto energético mediante la estimulación de tejidos como el músculo o el tejido adiposo pardo (Dulloo, 2011; Marcotorchino *et al.*, 2014; Bonet *et al.*, 2017). Por este motivo, en esta Tesis Doctoral se postuló si el hidrolizado de clara de huevo con pepsina podía tener como tejidos diana otros órganos especializados en el gasto energético, como músculo o el tejido adiposo pardo. Para ello, se evaluó en estos tejidos la expresión de genes relacionados con el metabolismo oxidativo y la termogénesis.



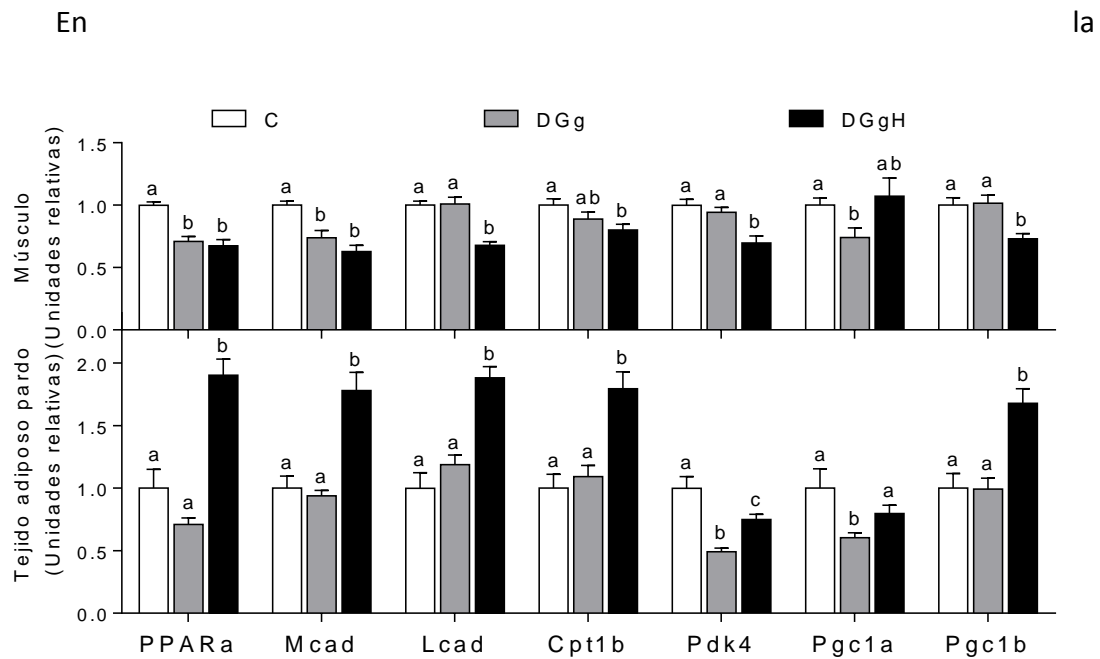
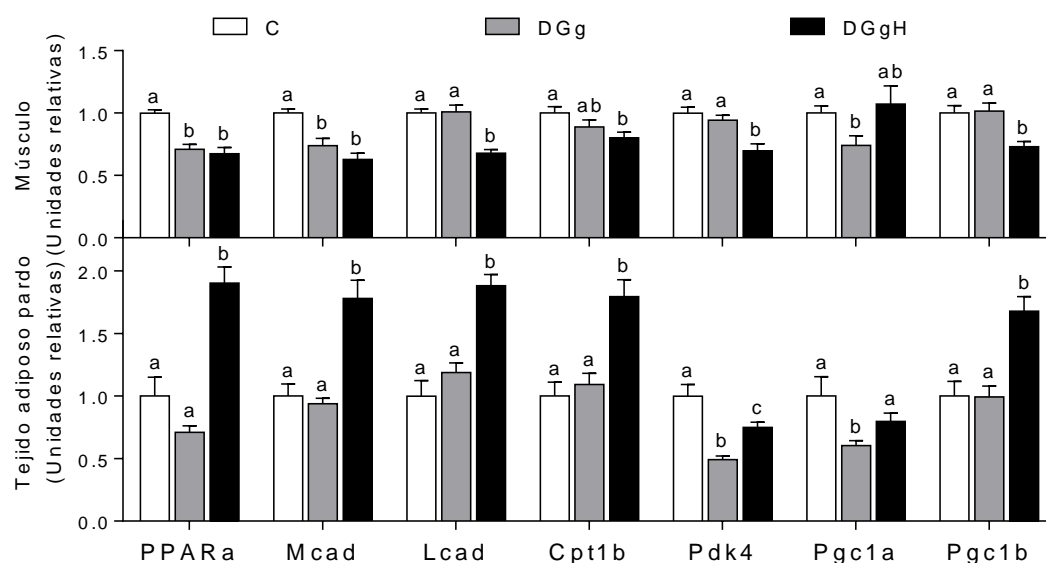


Figura 44 se muestran los resultados obtenidos tras evaluar la expresión de genes que codifican algunas enzimas implicadas en rutas oxidativas y de gasto energético en el tejido muscular y en el tejido adiposo pardo. Respecto a los resultados observados en el tejido muscular, los grupos DGg y DGgH mostraron una reducción significativa de la expresión de los genes PPAR $\alpha$  y Mcad al comparar estos valores con los del grupo control. No se observaron diferencias significativas entre los grupos DGg y DGgH para ninguno de estos genes. El grupo DGgH redujo significativamente la expresión del gen Lcad respecto a los grupos C y DGg. Aunque no se observaron diferencias significativas, el grupo DGg redujo ligeramente la expresión del gen Cpt1B respecto al grupo control, y en el grupo DGgH sí que se disminuyó significativamente la expresión de Cpt1B respecto al grupo control. No se observaron diferencias significativas en la expresión del gen Pdk4 entre los grupos C y DGg, pero el grupo DGgH redujo significativamente estos valores al compararlos con los grupos C y DGg. Respecto a la expresión de PGC1 $\alpha$ , se observó una reducción significativa de estos valores en el grupo DGg al compararlos con el grupo control. Aunque el grupo DGgH no mostró diferencias significativas en la expresión de este gen al compararlo con los grupos C y DGg, sí se observó una tendencia a aumentar estos valores respecto al grupo DGg. El grupo DGgH redujo significativamente la expresión del gen PGC1 $\beta$  en comparación con los grupos C y DGg.

En relación a los resultados observados en tejido adiposo pardo (Figura 44), no se observaron diferencias significativas entre los grupos C y DGg para la expresión génica de PPAR $\alpha$ , Mcad, Lcad ni Cpt1B. El grupo DGgH mostró, sin embargo, un aumento significativo de la expresión de estos genes al comparar estos valores con los de los grupos C y DGg. El grupo DGg redujo significativamente la expresión del gen Pdk4 respecto al grupo control. El grupo DGgH aumentó significativamente la expresión de este gen en comparación con el grupo DGg, aunque no alcanzó los valores del grupo control. El grupo DGg redujo significativamente la expresión del gen PGC1 $\alpha$  respecto al grupo control, y sin embargo la expresión de este gen en el grupo DGgH fue similar a la observada en el grupo control. Finalmente, no se observaron diferencias significativas en la expresión de PGC1 $\beta$  entre los grupos C y DGg, pero la expresión de este gen aumentó de forma significativa en el grupo DGgH respecto a los grupos C y DGg.



**Figura 44.** Expresión de genes que codifican para enzimas implicadas en rutas oxidativas y de gasto energético en el tejido muscular y en el tejido adiposo pardo de varios grupos experimentales al finalizar el periodo experimental del estudio. Grupos experimentales: Grupo control (C), grupo de dieta grasa con glucosa (DGg) y grupo de dieta grasa con glucosa + 1 g/kg-día de hidrolizado (DGgH). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó el test de Mann-Whitney para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores  $P < 0.05$ . Las letras diferentes representan la existencia de diferencias significativas entre grupos.

Los resultados referentes a la expresión de genes implicados en el metabolismo oxidativo y el gasto energético en el tejido muscular muestran una expresión reducida de todos los genes evaluados en el grupo DGgH en comparación con el grupo control, a excepción del gen PGC1 $\alpha$ . El grupo DGg no mostró sin embargo, reducciones significativas en la expresión de algunos de estos genes (Lcad, Cpt1B, Pdk4 y PGC1 $\beta$ ) en comparación con el grupo control. Estos resultados sugieren la inhibición del metabolismo oxidativo en el tejido muscular tras el consumo de hidrolizado de clara de huevo. Estos resultados son sin embargo contrarios a los resultados de la expresión de genes implicados en el metabolismo oxidativo y el gasto energético observados en el tejido adiposo pardo. En el grupo DGgH, los resultados observados sugieren una importante activación del metabolismo oxidativo en este tejido tras el consumo de hidrolizado de clara de huevo con pepsina. Múltiples investigadores han puesto de manifiesto la relación inversa que existe entre la actividad oxidativa del tejido adiposo pardo y el tejido muscular (Sánchez-Delgado *et al.*, 2015; Palmer y Clegg, 2017; Aldiss *et al.*, 2018). De hecho, se ha descrito que la activación de la termogénesis no asociada al temblor en el tejido adiposo pardo conduce a una menor termogénesis en el tejido muscular, lo cual podría reducir el gasto energético en este último tejido (Palmer y Clegg, 2017).

Cabe la posibilidad de que el consumo del hidrolizado de clara de huevo con pepsina pudiera producir un aumento significativo del gasto energético en el tejido adiposo pardo, limitando así el desarrollo de obesidad. Sin embargo, para corroborar esta hipótesis se necesitaría realizar estudios funcionales en los que se evaluara el gasto energético *in vivo* mediante el uso de jaulas metabólicas en las que se monitorizaran los gases respiratorios en los animales de experimentación. El aumento de la expresión del gen PGC1 $\beta$ , uno de los reguladores más importantes de biogénesis mitocondrial (Harms y Seale, 2013; Wada y Nakatsuka, 2016), en el tejido adiposo pardo del grupo DGgH, sugiere, además de un mayor metabolismo oxidativo, un aumento del contenido mitocondrial en el tejido adiposo pardo de este grupo experimental. Este proceso es especialmente relevante ya que la correcta regulación de las dinámicas mitocondriales y las vías de biogénesis mitocondrial son de extrema

importancia para el adecuado mantenimiento del equilibrio oxidativo y las funciones mitocondriales en el interior celular (Wada y Nakatsuka, 2016).

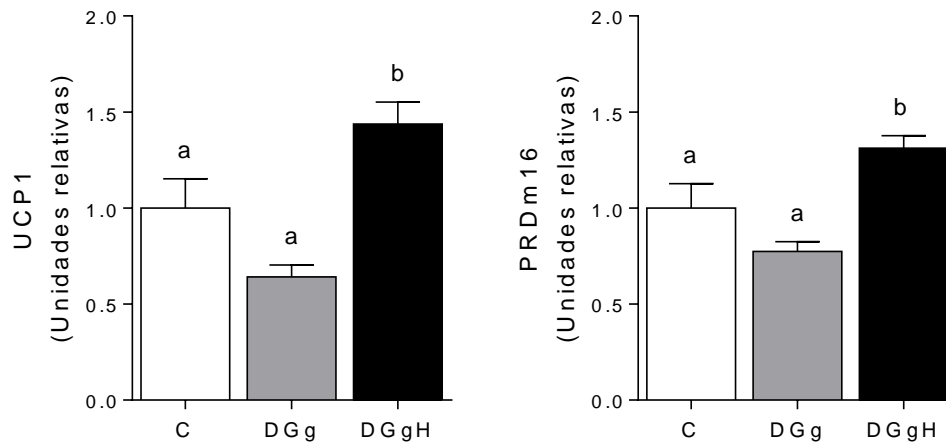
Los resultados obtenidos en el estudio de la expresión de genes del tejido adiposo pardo y del músculo indican que el consumo de hidrolizado de clara de huevo con pepsina podría activar el metabolismo oxidativo del tejido adiposo pardo, siendo éste uno de sus principales tejidos diana.

El tejido adiposo pardo está especializado en la disipación regulada de energía en forma de calor. Para ello, la ATP sintasa habitualmente presente en las membranas mitocondriales, se sustituye en este tejido por la proteína transmembrana termogenina (codificada por el gen UCP1), que utiliza la energía generada en la mitocondria para producir calor (Harms y Seale, 2013). La capacidad del tejido adiposo pardo para contrarrestar el consumo excesivo y continuado de energía se ha referido como uno de los principales mecanismos sobre los que actuar, ya que su activación mediante la administración de fármacos permitiría desarrollar nuevos y eficaces tratamientos contra la obesidad (Harms y Seale, 2013; Scheele y Nielsen, 2017). Estos nuevos tratamientos se centran, principalmente, en estimular la proliferación mitocondrial, así como en incrementar la capacidad termogénica de estas mitocondrias mediante la estimulación y la activación del factor de transcripción PRDm16 y de UCP1 (Harms y Seale, 2013).

Con el fin de evaluar la posible estimulación de la termogénesis en el tejido adiposo pardo tras el consumo de hidrolizado, se evaluó mediante qPCR la expresión génica de los principales marcadores de tejido adiposo pardo UCP1 y PRDm16 (Figura 45), así como de otros genes activadores de la biogénesis mitocondrial y dinámicas mitocondriales (Tabla 21).

En la Figura 45 se muestra la expresión génica de UCP1 y PRDm16 en el tejido adiposo pardo de los grupos experimentales C, DGg y DGgH al finalizar el estudio. No se observaron diferencias significativas entre los grupos C y DGg para la expresión de estos dos genes. El grupo DGgH, sin embargo, aumentó significativamente la expresión de los genes UCP1 y PRDm16 respecto a los grupos C y DGg en el tejido adiposo pardo.

Estos resultados sugieren un aumento de la capacidad termogénica del tejido adiposo pardo tras el consumo del hidrolizado de clara de huevo con pepsina.



**Figura 45.** Expresión génica de UCP1 y PRDM16 en el tejido adiposo pardo de los grupos al finalizar el estudio. Grupos experimentales: Grupo control (C), grupo de dieta grasa con glucosa (DGg) y grupo de dieta grasa con glucosa + 1 g/kg·día de hidrolizado (DGgH). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó el test de Mann-Whitney para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores  $P < 0.05$ . Las letras diferentes representan la existencia de diferencias significativas entre grupos.

La Tabla 21 muestra los resultados de expresión de genes activadores de biogénesis y dinámica mitocondrial en el tejido adiposo pardo de diferentes grupos experimentales. En esta tabla se observa que en el grupo DGg se redujo significativamente la expresión de los genes Tfam, Mfn2, de Tfb2m, Nrf1 y OPA1 respecto al grupo control. La expresión de Tfam, Mfn2, Nrf1 y OPA1 en el grupo DGgH fue, sin embargo, similar a la del grupo control, y se aumentó significativamente la expresión de Tfb2m en este grupo respecto a los grupos C y DGg. El grupo DGgH también aumentó significativamente la expresión del gen Dmn1L respecto al grupo DGg, pero ninguno de estos grupos mostró diferencias significativas respecto al grupo control. Estos resultados muestran una posible inhibición de la biogénesis mitocondrial en el grupo DGg, mediada por la menor expresión de Tfam, Tfb2m y Nrf1 observada en este grupo, así como una inhibición en los procesos de fusión mitocondrial, mediada por los genes Mfn2 y OPA1, los cuales también se encontraron menos expresados en el grupo DGg. Estas alteraciones no se observaron, sin embargo, en el grupo que

consumió hidrolizado (DGgH), que mostró valores de expresión similares a los del grupo control, excepto para el gen Tfb2m, para el cual mostró una expresión incluso mayor que el grupo control. La reducción del contenido mitocondrial en tejidos especializados en el metabolismo oxidativo se ha relacionado con el desarrollo de DM2 y obesidad (Jornayvaz y Shulman, 2010; Wada y Nakatsuka, 2016). De hecho, se ha descrito una reducción en la expresión del gen MFN2 en pacientes con DM2 y obesidad, y su posible relación con una función mitocondrial reducida en el tejido muscular (Wada y Nakatsuka, 2016).

**Tabla 21.** Expresión de genes activadores de biogénesis y dinámicas mitocondriales en el tejido adiposo pardo de varios grupos experimentales al finalizar el estudio. Grupos experimentales: Grupo control (C), grupo de dieta grasa con glucosa (DGg) y grupo de dieta grasa con glucosa + 1 g/kg/día de hidrolizado (DGgH). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó el test de Mann-Whitney para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores  $P < 0.05$ . Las letras diferentes representan la existencia de diferencias significativas entre grupos.

Gen (n $\geq$ 6)	Grupo experimental		
	C	DGg	DGgH
Tfam	1.00 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.52 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	1.05 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
Mfn2	1.00 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	0.72 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	1.22 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>
Tfb2m	1.00 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.69 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	1.25 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>
Nrf1	1.00 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.63 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.90 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
OPA1	1.00 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	0.53 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	1.12 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
Dmn1L	1.00 $\pm$ 0.10 <sup>ab</sup>	0.86 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	1.33 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>

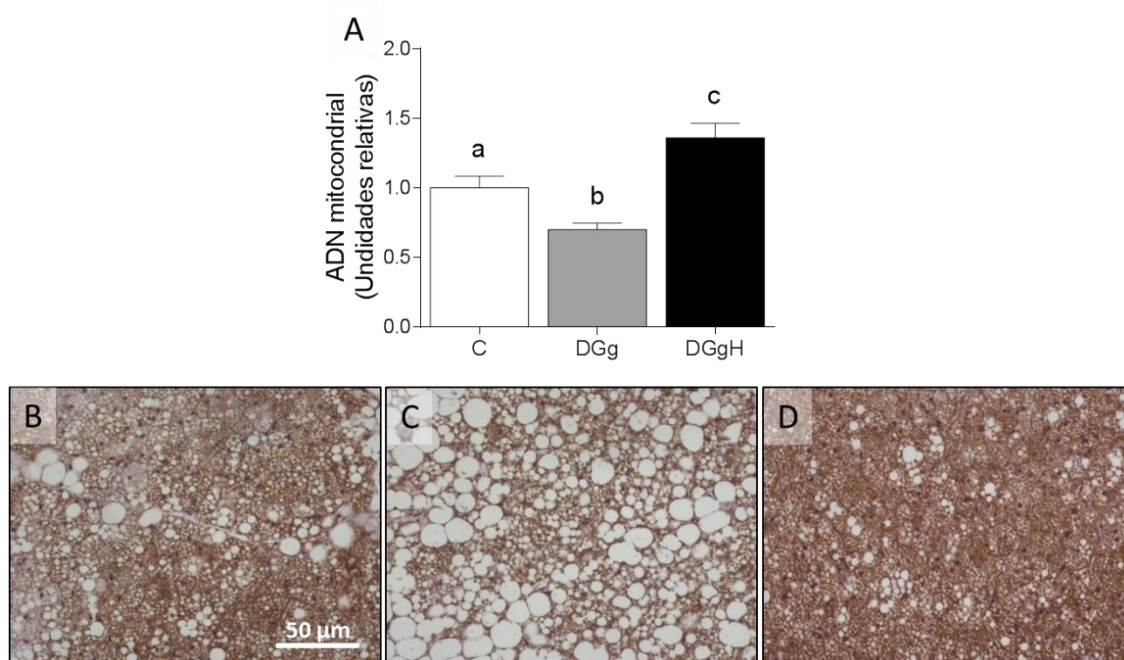
Los resultados observados en los marcadores termogénicos, así como en los genes reguladores de biogénesis y dinámicas mitocondriales, sugieren que el grupo que consumió una dieta grasa con glucosa (DGg) redujo su capacidad oxidativa en el tejido adiposo pardo. Por tanto, su capacidad para gastar el exceso de energía

consumida con la dieta se habría visto reducida, aumentando así su ganancia de peso corporal y el riesgo de desarrollar alteraciones cardiometabólicas asociadas a la condición de obesidad. El consumo de hidrolizado de clara de huevo con pepsina demostró capacidad para modificar las alteraciones ocasionadas por la dieta alta en grasa y azúcares, mediante la inducción de termogénesis y el aumento de la capacidad oxidativa del tejido adiposo pardo, reduciendo la ganancia de peso corporal y el riesgo de sufrir otras alteraciones como la DM2.

Aunque los resultados observados en la Tabla 21 sugieren la estimulación de las rutas de biogénesis mitocondrial que derivarían en un aumento del contenido en mitocondrias en el tejido adiposo pardo tras el consumo del hidrolizado, estos resultados no confirman a nivel cuantitativo que se haya producido un aumento real del contenido de mitocondrias en el tejido. Por ello, es necesario evaluar cuantitativamente este fenómeno en el tejido adiposo pardo de los diferentes grupos experimentales. Por este motivo, se cuantificó mediante qPCR el contenido de ADN mitocondrial (ADNm) de los diferentes grupos experimentales y se analizó, mediante técnicas inmunohistoquímicas este tejido, con el fin de identificar específicamente el contenido mitocondrial en secciones de tejido adiposo pardo en los diferentes grupos experimentales. Se utilizó para ello un anticuerpo monoclonal específico del complejo mitocondrial succinato deshidrogenasa de rata (Abcam).

En la Figura 46 se muestran los resultados referentes a la cuantificación del ADNm en los diferentes grupos experimentales e imágenes representativas de las tinciones inmunohistoquímicas realizadas en el tejido adiposo pardo. En ella se observa que el grupo DGg redujo significativamente el contenido de ADNm respecto al grupo control (Figura 46A). El grupo DGgH mostró un aumento muy significativo del ADNm en el tejido adiposo pardo respecto al grupo DGg, e incluso sobrepasó significativamente los valores del grupo control para este parámetro. El menor contenido mitocondrial del grupo DGg pone de manifiesto el mayor riesgo que presenta este grupo de animales para desarrollar estrés oxidativo y desórdenes asociados a esta alteración. En cuanto a las tinciones inmunohistoquímicas realizadas en las secciones del tejido adiposo pardo (Figura 46B-D), se observa que el grupo DGg mostró menor densidad de mitocondrias y un aumento del tamaño de las gotas

lipídicas de los adipocitos en este tejido, lo que indica el desarrollo de hipertrofia y una posible infiltración de adipocitos blancos en el tejido adiposo pardo de este grupo de animales. El grupo DGgH mostró, sin embargo, una densidad mayor de mitocondrias en los cortes histológicos y una reducción notable de las gotas lipídicas contenidas en los adipocitos pardos. Es importante mencionar que tanto los resultados inmunohistoquímicos, como la cuantificación de ADNm, muestran un aumento del contenido mitocondrial en el tejido adiposo pardo del grupo DGgH, incluso al comparar estos resultados con los del grupo control.



**Figura 46.** Valoración del contenido de mitocondrias en el tejido adiposo pardo. (A) Cuantificación relativa de ADN mitocondrial en tejido adiposo pardo, (B-D) imágenes representativas de cortes histológicos de tejido adiposo pardo tras una tinción inmunohistoquímica específica para mitocondrias (objetivo 40x) al finalizar el periodo experimental. Grupos experimentales: (Imagen B) Grupo control (C), (imagen C) grupo de dieta grasa con glucosa (DGg) y (imagen D) grupo de dieta grasa con glucosa + 1 g/kg-día de hidrolizado (DGgH). Los datos representan los valores medios  $\pm$  EEM para un mínimo de 6 animales. Se utilizó el test de Mann-Whitney para analizar los resultados y se consideró significativa la diferencia para valores  $P < 0.05$ . Las letras diferentes representan la existencia de diferencias significativas entre grupos.

Estos resultados sugieren que el consumo de hidrolizado de clara de huevo con pepsina podría activar el tejido adiposo pardo mediante el aumento del contenido mitocondrial y de los marcadores de termogénesis, y podría estimular de esta forma el gasto energético y la oxidación de ácidos grasos en este tejido. Sin embargo, para poder establecer como el principal mecanismo de acción de este hidrolizado la



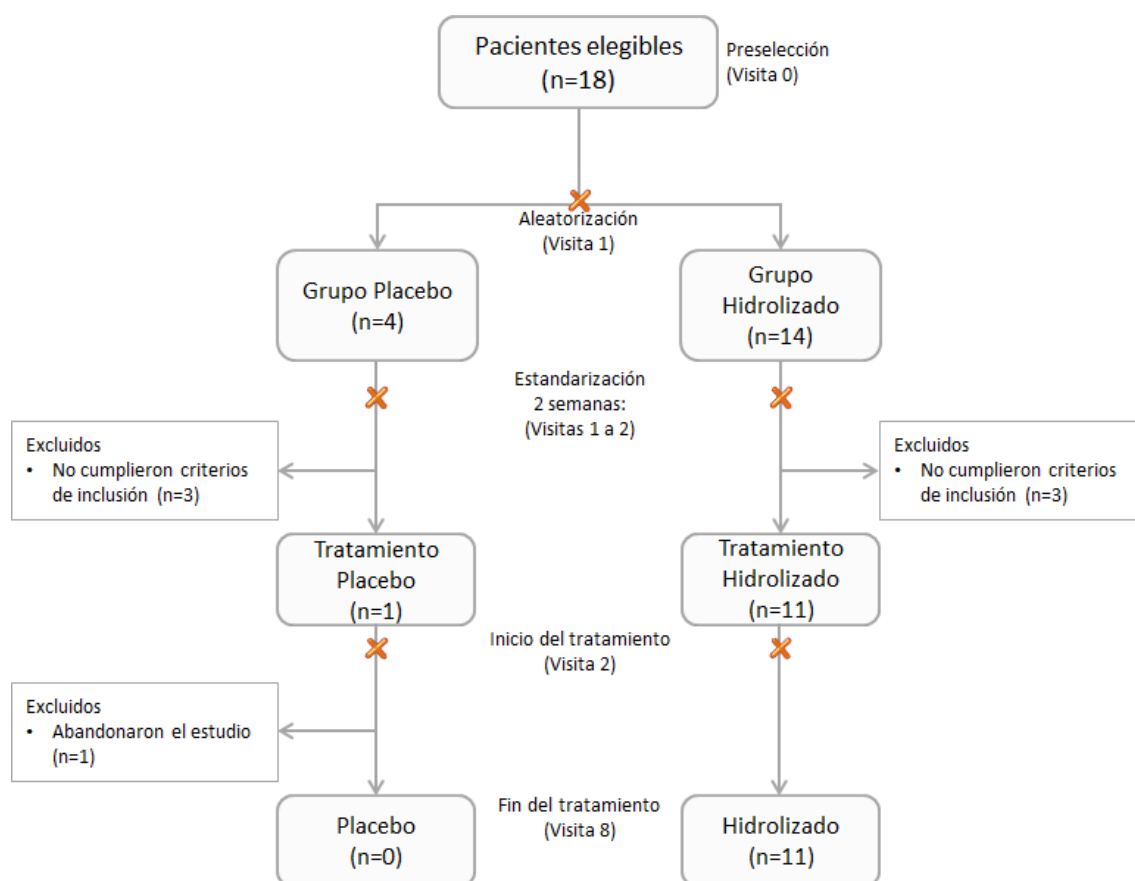
estimulación de la termogénesis, sería necesario llevar a cabo más estudios en los que se evalúe *in vivo* la activación fisiológica del tejido adiposo pardo en animales de experimentación, mediante el uso de calorimetría indirecta, o mediante tomografía por emisión de positrones utilizando fluorodesoxiglucosa (FDG-TEP) para evaluar la utilización de los nutrientes por parte de los diferentes tejidos.

En conjunto, los resultados observados en la expresión génica de tejidos implicados en la acumulación y el gasto energético, en combinación con los resultados fisiológicos observados en este estudio, sugieren que el consumo de hidrolizado de clara de huevo con pepsina podría utilizarse como un alimento funcional que podría ayudar a controlar y/o revertir las alteraciones cardiometabólicas asociadas al desarrollo de síndrome metabólico.

#### **4.3. Evaluación de la eficacia y seguridad del hidrolizado de clara de huevo con pepsina en pacientes con síndrome metabólico.**

Una de las principales exigencias de la Normativa Europea para aceptar una alegación de salud en un alimento funcional incluye que este efecto se haya evaluado en humanos mediante la realización de estudios de intervención en humanos (Aggett *et al.*, 2005). El alimento funcional deberá además demostrar su seguridad tras su administración y consumo en la población humana. Por ello, nos propusimos en esta Tesis Doctoral llevar a cabo un estudio de intervención para evaluar la eficacia y seguridad del consumo del hidrolizado de clara de huevo con pepsina en humanos, y específicamente analizar su eficacia en el tratamiento de algunas de las alteraciones asociadas al síndrome metabólico.

En la Figura 47 se resume el número de pacientes que participaron durante el estudio de intervención en humanos y cuál fue su evolución en el estudio. Los participantes del estudio fueron seleccionados en base a los criterios de inclusión y exclusión previamente detallados en la metodología y aleatorizados de forma ciega en dos grupos de tratamiento en (Hidrolizado:Placebo).



**Figura 47.** Evolución del número de participantes durante el estudio de intervención en humanos.

Un total de 18 pacientes se derivaron desde sus centros de atención primaria (Visita 0) al Hospital de la Defensa Gómez Ulla con posible cumplimiento de los criterios de inclusión establecidos para el estudio. Durante la Visita 1, ya en el Hospital, se comprobó la historia clínica de los pacientes y tras la confirmación del cumplimiento de los criterios de inclusión, se les asignó aleatoriamente en un grupo de tratamiento. Los 18 pacientes potenciales cumplieron los criterios de inclusión. Un total de 4 participantes fueron incluidos en el grupo de placebo y 14 en el grupo de hidrolizado.

En la Visita 1, y tras haberles asignado un grupo de tratamiento, se realizó una fase de estandarización en la que a todos los participantes se les administró placebo durante dos semanas. Este periodo tuvo como finalidad comprobar el correcto cumplimiento del tratamiento por parte de los pacientes y unificar los valores de inicio del tratamiento para todos ellos. Posteriormente, en la Visita 2 se realizó la primera analítica de sangre que sería tomada como valor basal a partir de la cual evaluar el

progreso de los participantes. Tras evaluar estos resultados del análisis de sangre, un total de 6 participantes (3 pertenecientes al grupo placebo y 3 pertenecientes al grupo de hidrolizado) fueron eliminados del estudio por no cumplir los criterios establecidos en la Tabla 12. En la Tabla 22 se muestra la codificación utilizada para identificar a los pacientes así como un resumen de los criterios de inclusión y los valores de cumplimiento de los mismos por parte de cada paciente.

Como placebo se eligió maltodextrina. Este compuesto derivado del almidón se ha utilizado en múltiples estudios de intervención para la evaluación de fármacos y algunos alimentos o ingredientes funcionales debido a su utilización habitual como excipiente tanto en el desarrollo de fármacos como en la producción de alimentos (Corsello *et al.*, 2017; König *et al.*, 2018; Vaghef-Mehrabany *et al.*, 2018).

La dosificación elegida para llevar a cabo este estudio (4 g/día) se seleccionó en base a las dosis utilizadas previamente en ensayos en animales (Garcés Rimón, 2014; Garcés-Rimón *et al.*, 2016a; Garcés-Rimón *et al.*, 2018; Moreno-Fernández *et al.*, 2018), y siguiendo las indicaciones de Reagan-Shaw *et al.* (2007) para extrapolar la dosis correspondiente a los humanos. Se decidió administrar el producto en 2 tomas separadas debido a que el hidrolizado de clara de huevo se administró liofilizado en monodosis y no encapsulado, de forma que su liberación y absorción se realizarían de forma prácticamente inmediata tras su ingesta. Este tipo de administración en 2 tomas permitiría mantener el ingrediente activo en el torrente sanguíneo de los pacientes durante un periodo de tiempo mayor que si se hubiera administrado la totalidad de la dosis establecida en una única toma.

Durante el periodo de tratamiento (desde la visita 2 hasta la visita 8), los participantes visitaron el hospital periódicamente para evaluar su estado de salud y la posible aparición de efectos secundarios. Antes de la finalización del tratamiento, un paciente perteneciente al grupo placebo decidió abandonar el estudio por motivos personales. Por lo que finalmente, un total de 11 participantes, todos pertenecientes al grupo de hidrolizado, finalizaron el estudio de intervención, y las muestras recogidas se utilizaron para su análisis.

Debido al carácter multifactorial del síndrome metabólico, no se han seguido unos criterios de inclusión totalmente homogéneos a la hora de seleccionar a los pacientes del estudio de intervención, ya que dentro de la definición más aceptada para diagnosticar el síndrome metabólico se incluyen múltiples factores de los cuales los pacientes deben cumplir al menos dos, pero no tienen por qué ser en todos los pacientes los mismos (Tabla 22).

En base a los criterios de inclusión y exclusión diseñados para el diagnóstico de la patología multifactorial objeto de este estudio de intervención, nos encontramos con una gran dificultad para reclutar participantes, debido principalmente a la heterogeneidad de síntomas entre pacientes que presenta la manifestación de una patología como es el síndrome metabólico. Aunque todos los pacientes seleccionados presentaban como desorden base la obesidad abdominal, no todos presentaron los mismos dos desórdenes necesarios para el diagnóstico de síndrome metabólico de entre los seis propuestos como criterio de inclusión en el estudio. Por este motivo, no fue posible realizar el análisis estadístico de los resultados ya que no todos los pacientes que participaron en el estudio presentaron las mismas alteraciones cardiometabólicas. Esto ocasionó una notable reducción del tamaño muestral en cada una de las variables analizadas al finalizar el estudio.

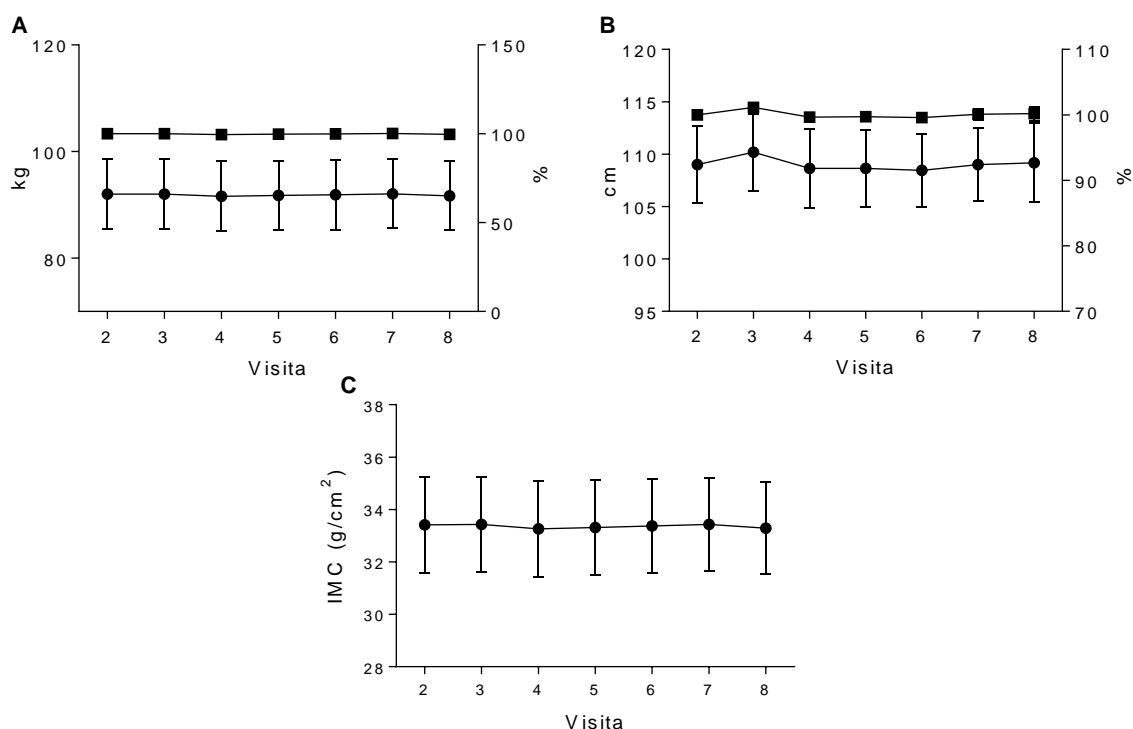
Es importante señalar que ninguno de los pacientes que participó en este estudio de intervención en humanos manifestó haber experimentado efectos secundarios de ningún tipo durante el periodo de tratamiento. Como se explicó en el apartado de metodología, a ningún paciente se le requirió realizar modificaciones en sus hábitos de alimentación ni de actividad física, y todos ellos fueron capaces de mantener sin dificultades su estilo de vida habitual. Esto indica que el consumo de hidrolizado de clara de huevo en la dosis administrada durante todo el periodo experimental es seguro y apto para su utilización como alimento funcional.

## Resultados y Discusión

**Tabla 22.** Codificación de los participantes en el estudio de intervención en humanos y revisión del cumplimiento de los criterios de inclusión en la visita 2, tras realizar el periodo de estandarización previsto en el protocolo experimental. CI: Criterios de Inclusión; H: Hombre(s); IMC: Índice de Masa Corporal; M: Mujer(es); PAS: Presión Arterial Sistólica; PAD: Presión Arterial Diastólica.

						CRITERIOS DE INCLUSIÓN (VISITA 2)								¿Finalizó el estudio?	Observaciones
						Perímetro abdominal	+ 2 de los siguientes								
							H>102 cm M>88 cm	IMC > 25	TG >200 mg/dL	Glucemia en ayunas >100 mg/dL	Col. HDL H<40 mg/dL M<50 mg/dL	PAS ≥140 mmHg	PAD ≥95 mmHg		
Código	Edad	Sexo	Peso (kg)	Altura (m)	Tratamiento										
001	51	H	124.8	1.78	Hidrolizado	125	39.39	351	79	30	116	73	SI	SI	
002	51	M	116.8	1.60	Hidrolizado	129	45.63	107	122	56	123	76	SI	SI	
003	54	M	91.9	1.65	Hidrolizado	105	33.76	74	74	48	128	89	SI	SI	
004	46	M	73.9	1.65	Placebo	104	27.14	290	86	42	110	70	SI	NO	Abandono (motivos personales)
005	52	M	68.9	1.41	Hidrolizado	103	34.66	254	91	45	107	61	SI	SI	
006	46	M	93.5	1.69	Hidrolizado	110	32.74	131	103	51	105	64	SI	SI	
007	31	M	90.0	1.66	Placebo	94	32.66	38	89	54	116	75	NO	NO	No cumplió inclusión visita 2
008	49	M	74.2	1.74	Hidrolizado	104	24.51	240	103	44	137	81	SI	SI	
009	66	H	93.2	1.73	Hidrolizado	112	31.14	141	95	37	137	81	SI	SI	
010	28	M	73.0	1.65	Placebo	102	26.81	124	87	51	119	69	NO	NO	No cumplió inclusión visita 2
011	53	M	85.4	1.57	Hidrolizado	108	34.65	85	94	37	134	88	SI	NO	Abandono (motivos personales)
012	54	M	79.0	1.62	Placebo	101	30.10	155	92	53	123	84	NO	NO	No cumplió inclusión visita 2
013	46	H	116.5	1.81	Hidrolizado	116	35.56	62	66	50	144	96	SI	SI	
014	53	M	65.7	1.60	Hidrolizado	89	25.66	126	83	31	110	77	SI	SI	
015	51	M	63.5	1.50	Hidrolizado	92	28.22	240	89	43	114	72	SI	SI	
016	35	H	102.9	1.68	Hidrolizado	114	36.46	209	92	50	124	75	SI	SI	
017	50	H	105.5	1.80	Placebo	114	32.56	137	86	42	117	77	NO	NO	No cumplió inclusión visita 2
018	39	M	83.5	1.58	Hidrolizado	100	33.45	146	84	69	131	91	NO	NO	No cumplió inclusión visita 2

En la Figura 48 se representa la evolución de los parámetros antropométricos a lo largo del periodo de intervención. Se muestra el peso corporal, el perímetro abdominal y el IMC de los pacientes participantes en el estudio de intervención en humanos durante las 12 semanas de tratamiento con el hidrolizado de clara de huevo con pepsina. Cabe destacar que no se observaron modificaciones en ninguna de las medidas antropométricas evaluadas en la visita 8 respecto a la visita 2.

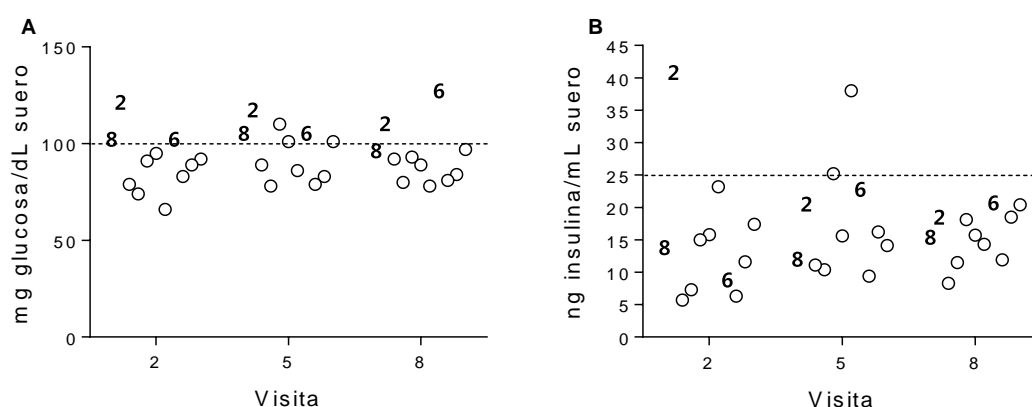


**Figura 48.** Evolución a lo largo del estudio de (A) el peso corporal, (B) el perímetro abdominal y (C) el índice de masa corporal (IMC) de los participantes del estudio, representado como valores absolutos (●) y como el porcentaje de ganancia o pérdida de peso con respecto a la visita 2 (■).

Debido al limitado tamaño muestral, y a que no todos los participantes del estudio de intervención presentaron las mismas alteraciones cardiometabólicas al inicio del tratamiento (Tabla 22), los resultados se presentarán mediante gráficas de dispersión con la finalidad de mostrar la variación individual de cada uno de los participantes.

En la Figura 49 se representa la distribución de los datos de los niveles de glucosa e insulina en el plasma de los pacientes tratados con hidrolizado de clara de

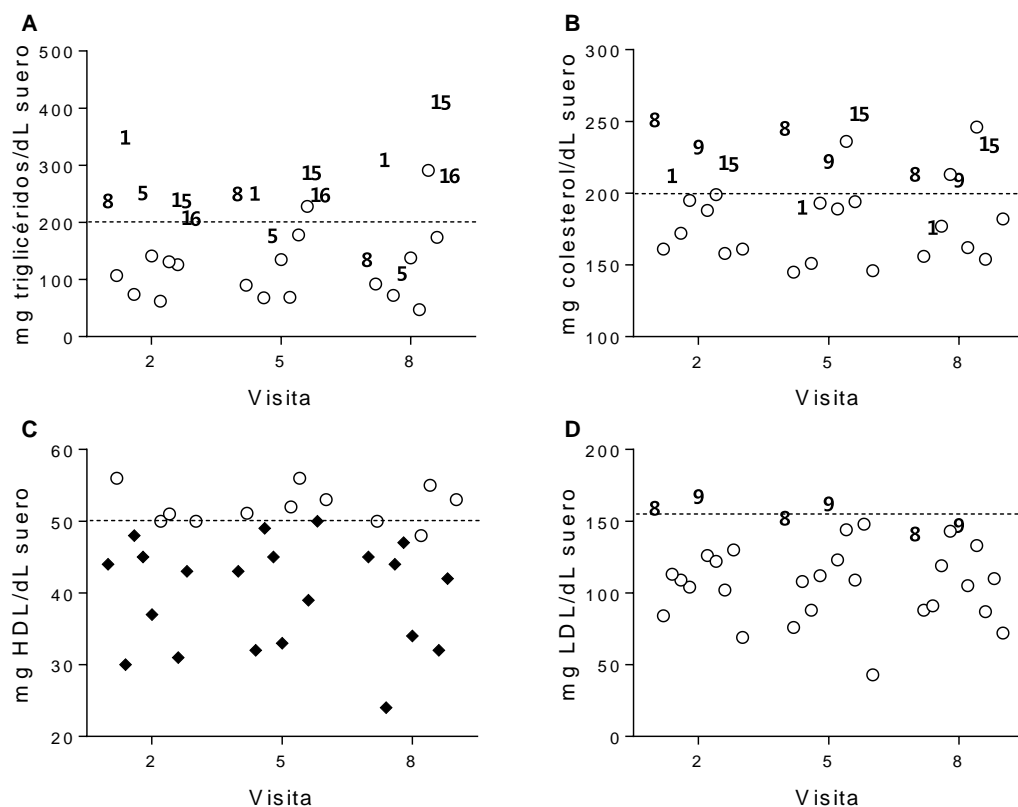
huevo con pepsina a lo largo del estudio de intervención. En la Figura 49A se observa que 3 de los pacientes que participaron en el estudio de intervención, en concreto los participantes 2, 6 y 8 presentaron niveles aumentados de glucosa en plasma respecto al valor de referencia considerado como normal. El aumento de los niveles de glucosa en ayunas se utilizó como uno de los criterios de inclusión utilizado para este estudio de intervención. Dos de estos pacientes, concretamente el 2 y el 8, disminuyeron ligeramente los niveles de glucosa en plasma después del tratamiento con hidrolizado de clara de huevo, e incluso el paciente número 8 alcanzó los niveles de normalidad establecidos para este parámetro. Únicamente el paciente 6 presentó niveles de glucosa en plasma más elevados al final del estudio, cuando comparamos esos valores finales con los valores de este paciente al inicio del estudio de intervención. Ninguno de los pacientes que inició el estudio con niveles normales de glucosa en plasma presentó alteraciones en este parámetro al finalizar el tratamiento. De los pacientes que presentaron niveles altos de glucosa en el plasma, sólo el paciente 2 mostró niveles elevados de insulina al inicio del estudio. Estos valores disminuyeron por debajo del umbral de normalidad al finalizar el estudio después del tratamiento con el hidrolizado de clara de huevo. Ninguno de los otros participantes mostró cambios en los niveles de insulina plasmática a lo largo del periodo de estudio.



**Figura 49.** Evolución de los niveles de (A) glucosa e (B) insulina en el suero de los participantes del estudio. Se representan: Pacientes que no presentaron alteraciones de los niveles de glucosa en plasma al inicio del tratamiento (○) y pacientes que presentaron alterados los niveles de glucosa en plasma al inicio del tratamiento (2,6,8). La línea discontinua representa el límite del rango de normalidad del parámetro evaluado.

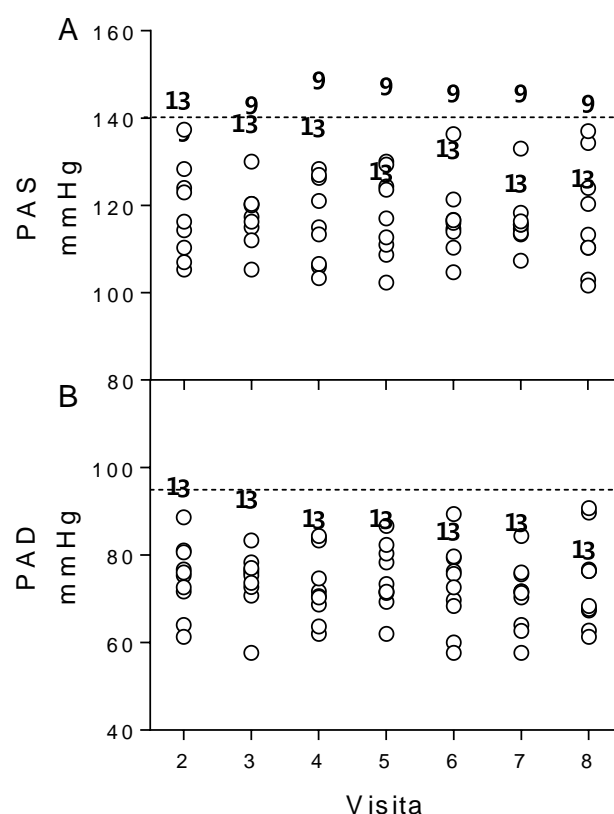
En cuanto al metabolismo lipídico, en la Figura 50 se representan los marcadores lipídicos evaluados en los pacientes a lo largo del periodo de estudio. De los marcadores evaluados, las alteraciones de los niveles de TG y de colesterol HDL en plasma se consideraron criterio de inclusión para participar en el estudio. Los pacientes 1, 5, 8, 15 y 16 presentaron niveles elevados de TG en plasma en la visita 2 del estudio de intervención (Figura 50A). Se observó que algunos de estos pacientes (5 y 8) redujeron los niveles plasmáticos de triglicéridos al final del estudio. Sin embargo, esto no ocurrió en el caso de los pacientes 15 y 16, quienes mostraron un aumento de sus niveles de TG en plasma a lo largo del periodo de tratamiento. En cuanto a los niveles de colesterol total en plasma (Figura 50B), los pacientes 1, 8, 9 y 15 presentaron un aumento de este parámetro. A excepción del paciente 15, todos los pacientes que iniciaron el estudio con un aumento en los niveles de colesterol total redujeron estos valores, acercándose o llegando a los niveles de normalidad establecidos para este parámetro. Cabe destacar que nuevamente el paciente número 6, a pesar de no mostrar alteraciones en los niveles de lípidos al inicio del estudio, experimentó un aumento considerable de los niveles de TG y colesterol en plasma a lo largo del periodo de intervención. No se observaron modificaciones de los niveles de colesterol HDL en el plasma de los pacientes durante el periodo de estudio (Figura 50C). Respecto a los niveles de colesterol LDL en plasma (Figura 50D), los pacientes 8 y 9 presentaron este parámetro elevado al inicio del estudio, y los niveles de colesterol LDL se redujeron a lo largo del estudio tras el consumo del hidrolizado de clara de huevo y se alcanzaron rangos de normalidad en la visita 8.





**Figura 50.** Evolución de los niveles de (A) triglicéridos, (B) colesterol total, (C) colesterol HDL y (D) colesterol LDL en el suero de los participantes del estudio. Se representan: Pacientes que no presentaron alteraciones en los parámetros representados al inicio del tratamiento (○) y pacientes que presentaron alteraciones en los parámetros representados al inicio del tratamiento (1,5,8,9,15,16, ◆). La línea discontinua representa el límite del rango de normalidad del parámetro evaluado.

Como se puede observar en la Tabla 22, un porcentaje muy bajo de participantes del estudio presentaba valores elevados de PAS y/o de PAD. En la Figura 51 se representan los valores de PAS y de PAD a lo largo del estudio. De la totalidad de los participantes en el estudio de intervención en humanos, el paciente número 13 fue el único que presentó valores elevados de PAS al inicio del estudio. Este paciente consiguió, de hecho, reducir los valores de PAS, alcanzando los rangos de normalidad después de recibir el tratamiento con el hidrolizado de clara de huevo, desde la visita 3 y hasta el final del estudio. El resto de participantes presentaron niveles normales de PAS y de PAD y estos valores se mantuvieron estables a lo largo del periodo de estudio, a excepción del paciente 9 (Figura 51A), que experimentó un aumento de la PAS durante el estudio.



**Figura 51.** Evolución de la presión arterial (A) sistólica (PAS) y (B) diastólica (PAD) de los pacientes a lo largo del estudio. Se representan pacientes que no presentaron alteraciones en los parámetros representados al inicio del tratamiento (○) y pacientes que presentaron alteraciones en los parámetros representados al inicio del tratamiento (13). La línea discontinua representa el límite del rango de normalidad para el parámetro evaluado.

En la Tabla 23 se presenta una revisión de los parámetros de inclusión para todos los participantes del estudio de intervención que finalizaron el periodo de tratamiento. En ella se observa que dos de los pacientes que, al inicio del estudio, reunían los criterios de inclusión para el diagnóstico de síndrome metabólico y participación recogidos en la metodología de la presente Tesis Doctoral, no reunieron estos requisitos al finalizar el estudio. Este resultado implica que estos dos participantes, concretamente los pacientes 8 y 13 mejoraron su condición de síndrome metabólico durante el estudio.

Una de las limitaciones de este estudio que ya hemos mencionado al inicio de esta Discusión es que debido al diseño experimental, a la forma de reclutar los

pacientes que participaban en el estudio y debido al escaso número de pacientes que se consiguieron incluir, no fue posible evaluar el efecto placebo, y todos los resultados obtenidos pertenecen a participantes que consumieron el hidrolizado de clara de huevo. El uso de un grupo placebo en un estudio de intervención en humanos es un control muy importante (Brown *et al.*, 2018), aunque no excluyente ya que de hecho existen estudios en los que no se administra placebo a los participantes, y se utiliza como control su estado inicial previo a recibir el tratamiento de estudio (Vaghef-Mehrabany *et al.*, 2018). El otro factor limitante es el tamaño de la muestra que fue considerablemente pequeño, sobre todo teniendo en cuenta el carácter multifactorial del síndrome metabólico y que no todos los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión presentaron las mismas alteraciones cardiometabólicas.

## Resultados y Discusión

**Tabla 23.** Revisión del estado general de los participantes que finalizaron el estudio de intervención en humanos y revisión del cumplimiento de los criterios de inclusión al finalizar el estudio. CI: Criterios de Inclusión; H: Hombre(s); IMC: Índice de Masa Corporal; M: Mujer(es); PAS: Presión Arterial Sistólica; PAD: Presión Arterial Diastólica; TG: Triglicéridos; V2: Visita 2; V8: Visita 8.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN														
Código paciente	Edad	Sexo	Altura (m)	Tratamiento	Nº Visita	Peso (kg)	Perímetro abdominal H > 102 cm M > 88 cm	+ 2 de los siguientes						
								IMC > 25	TG > 200 mg/dL	Glucemia en ayunas > 100 mg/dL	Colesterol HDL H < 40 mg/dL M < 50 mg/dL	PAS ≥140 mmHg	PAD ≥95 mmHg	Cumple CI en V8?
001	51	H	1.78	Hidrolizado	V2	124.8	125	39.39	351	79	30	116	73	SI
					V8	123.7	127	39.04	312	92	24	102	68	
002	51	M	1.60	Hidrolizado	V2	116.8	129	45.63	107	122	56	123	76	SI
					V8	113.2	125	44.22	92	111	50	120	76	
003	54	M	1.65	Hidrolizado	V2	91.9	105	33.76	74	74	48	128	89	SI
					V8	92.5	108	33.98	72	80	44	137	90	
005	52	M	1.41	Hidrolizado	V2	68.9	103	34.66	254	91	45	107	61	SI
					V8	66.7	102	33.55	113	93	47	110	61	
006	46	M	1.69	Hidrolizado	V2	93.5	110	32.74	131	103	51	105	64	SI
					V8	98.7	120	34.56	291	128	55	113	67	
008	49	M	1.74	Hidrolizado	V2	74.2	104	24.51	240	103	44	137	81	NO
					V8	74.4	104	24.57	137	97	45	124	76	
009	66	H	1.73	Hidrolizado	V2	93.2	112	31.14	141	95	37	137	81	SI
					V8	92.4	109	30.87	138	89	34	143	89	
013	46	H	1.81	Hidrolizado	V2	116.5	116	35.56	62	66	50	144	96	NO
					V8	114.7	115	35.01	47	78	48	126	81	
014	53	M	1.60	Hidrolizado	V2	65.7	89	25.66	126	83	31	110	77	SI
					V8	64.2	90	25.08	174	81	32	103	67	
015	51	M	1.50	Hidrolizado	V2	63.5	92	28.22	240	89	43	114	72	SI
					V8	65.0	91	28.89	412	84	42	110	62	
016	35	H	1.68	Hidrolizado	V2	102.9	114	36.46	209	92	50	124	75	SI
					V8	103.1	114	36.53	284	97	53	134	76	

En general, no se observaron modificaciones en el peso corporal ni en la composición corporal de los pacientes a lo largo del estudio. Sin embargo, varios de los pacientes indicaron en las encuestas de hábitos dietéticos y de actividad haber aumentado su ingesta durante el periodo de tratamiento, coincidiendo el desarrollo del estudio con periodos vacacionales. Este inconveniente podría haberse evitado si se hubieran proporcionado guías de alimentación a los pacientes o estableciéndoles una dieta a seguir durante el periodo de duración del estudio. Sin embargo, algunos investigadores prefieren no establecer una dieta estricta durante los periodos de tratamiento para favorecer que los participantes mantengan su estilo de vida habitual y que no se produzcan cambios adicionales que interfieran con los resultados del estudio (Xu *et al.*, 2018). En algunos estudios lo que si se ha observado es una alteración de los parámetros evaluados en el grupo placebo y, sin embargo, el grupo que consumía el producto bioactivo mantenía estables aquellos parámetros en los que el grupo placebo mostraba alteraciones (Byun *et al.* 2016). En nuestro estudio, se observó de forma general una mejoría en los parámetros bioquímicos y de presión arterial en aquellos participantes que mostraban alterados algunos de estos parámetros al inicio del estudio, especialmente en los pacientes 8 y 13. Además, en la mayoría de los participantes, exceptuando el paciente 6, que empeoró los parámetros estudiados, se observaron cambios positivos en los análisis realizados. Es posible que esta situación de estabilidad o ligera mejora observada en el desarrollo del síndrome metabólico en los participantes del estudio pudiera ser debida al consumo del hidrolizado de huevo, ya que el desarrollo de esta patología no se detiene y de hecho, los análisis realizados en los participantes del estudio indican que la mayoría de ellos se encuentran en las fases iniciales de esta enfermedad. En el caso del paciente número 6, que mostró un aumento de los niveles de glucosa, insulina, TG y colesterol en plasma a lo largo del estudio, observamos en los datos recogidos de este paciente durante la primera visita que se trataba de una mujer de 46 años, que estaba experimentando cambios hormonales, relacionados con la etapa de premenopausia, propios de su edad y sexo.

Se ha descrito la activación del tejido adiposo pardo y la termogénesis como los posibles mecanismos de acción del hidrolizado de clara de huevo con pepsina. Es

necesario considerar que, si bien se ha confirmado la existencia de depósitos activos de este tejido en humanos, estos depósitos reducen su tamaño y actividad con la edad, alcanzando valores muy reducidos a partir de los 40 o 50 años de edad en personas con poca actividad física (Lee *et al.*, 2014; Scheele y Nielsen, 2017). En caso de que el hidrolizado de clara de huevo con pepsina sea capaz de inducir una activación de estos depósitos, es posible que sea necesario un periodo prolongado de activación y proliferación del tejido adiposo pardo previo a observar modificaciones en el gasto energético y en el peso de los pacientes. Por ello, para observar diferencias relevantes en estos parámetros consideramos necesario un periodo de tratamiento con hidrolizado de clara de huevo y seguimiento más prolongados, aunque somos conscientes de que llevar esto a la práctica es muy complicado, pues la adherencia de los pacientes a los estudios de intervención y a los tratamientos se reduce si no se observa efectividad o si el tratamiento no muestra resultados a corto plazo.

Existen múltiples factores que pueden interferir con el efecto de los compuestos bioactivos derivados de productos alimentarios, entre los que se incluyen la matriz alimentaria, la composición química del compuesto y la estructura o cantidad de otros compuestos presentes en la dieta (Ribeiro Vieira *et al.*, 2017). Además, el metabolismo individual y la edad son factores muy influyentes en la respuesta de cada individuo frente a los compuestos que se les administran (Ribeiro Vieira *et al.*, 2017). Estos factores pudieron también influir en la variabilidad observada en los parámetros cardiometabólicos evaluados durante el seguimiento de los pacientes.

En resumen, los resultados obtenidos en este estudio de intervención en humanos pueden considerarse como un análisis preliminar del posible efecto que ocasiona en humanos el consumo del hidrolizado de clara de huevo con pepsina sobre las alteraciones cardiometabólicas asociadas al síndrome metabólico. En este estudio se ha demostrado que el consumo de hidrolizado de clara de huevo con pepsina es seguro, y podría por ello utilizarse como alimento funcional. Sin embargo, para conseguir su aprobación para ser comercializado con esta funcionalidad será necesario que sus efectos beneficiosos se demuestren en un número mayor de personas, y se deberán realizar además estos estudios de intervención sobre diferentes grupos de población, bien diseñados y que cuenten con un tamaño muestral adecuado.

# 5

CONCLUSIONES  
CONCLUSIONS

## CONCLUSIONES

Los resultados de esta Tesis Doctoral nos han llevado a las siguientes conclusiones:

1. El modelo animal de obesidad inducida por dieta más adecuado y en el que se concentran el mayor número de alteraciones asociadas al síndrome metabólico es el modelo experimental que recibió una dieta hipergrasa + agua con un 25% de glucosa (grupo DGg) durante 20 semanas.
2. Los animales del modelo de obesidad inducida por dieta seleccionado presentan entre otras alteraciones, un aumento significativo del peso corporal, del perímetro abdominal y del tamaño de los adipocitos del tejido adiposo epididimal. Estas ratas manifiestan además un estadio temprano de insulinoresistencia con presencia de neuropatía sensorial y un aumento de los marcadores de estrés oxidativo e inflamación. Los resultados observados en el tejido adiposo pardo indican también que existe un deterioro de los mecanismos de reparación y biogénesis mitocondrial en estos animales.
3. La administración, a partir de la semana 9 y hasta finalizar el estudio, de 1 g/kg-día de hidrolizado de clara de huevo con pepsina en el modelo experimental que recibió una dieta hipergrasa + agua con un 25% de glucosa durante 20 semanas (grupo DGgH) produjo los siguientes efectos:
  - a. Disminución del aumento de peso corporal, del perímetro abdominal y del tamaño de los adipocitos del tejido adiposo epididimal.
  - b. Reducción de los niveles de malondialdehído, de la capacidad antioxidante del plasma y normalización de los niveles de glutatión reducido en el hígado de los animales.
  - c. Disminución de la hiperglucemia y de la hiperinsulinemia plasmáticas y reversión del desarrollo de neuropatía periférica.



- d. Aumento de la expresión de genes oxidativos tales como PPAR $\alpha$ , Mcad, Lcad y Cpt1B, aumento de la expresión de los genes implicados en la biogénesis mitocondrial PGC1 $\beta$ , Mfn2, Tfb2m y aumento de la cantidad de mitocondrias en el tejido adiposo pardo. Incremento de la expresión de los genes termogénicos UCP1 y PRDm16 en este tejido.
4. La administración, a partir de la semana 9 y hasta la finalización del estudio, de 1 g/kg·día de hidrolizado de clara de huevo con pepsina en el grupo control del modelo experimental (grupo CH), no produjo cambios significativos respecto a los animales del grupo control que no tomaron el hidrolizado (grupo C).
5. La administración de 4 g diarios del hidrolizado de clara de huevo con pepsina durante 12 semanas, no provocó efectos adversos durante el estudio de intervención en ninguno de los participantes, por lo que su consumo puede considerarse seguro para los humanos.
6. La administración de 4 g diarios del hidrolizado de clara de huevo con pepsina durante 12 semanas, fue capaz de mejorar algunos de los parámetros cardiometabólicos monitorizados durante el estudio en aquellos participantes que los tenían alterados. En ninguno de los sujetos se observaron sin embargo disminuciones en el peso corporal o en el perímetro abdominal, a pesar de que todos los individuos presentaban valores elevados en estos dos parámetros.

**Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral el hidrolizado de clara de huevo con pepsina podría utilizarse como ingrediente para desarrollar alimentos funcionales útiles en la prevención y/o el tratamiento de algunas de las alteraciones que se asocian con el desarrollo de obesidad y/o de síndrome metabólico. Sin embargo, será necesario llevar a cabo más estudios para profundizar y establecer el mecanismo de acción del hidrolizado de clara de huevo, y también para demostrar claramente sus efectos beneficiosos sobre el ser humano. Entre las limitaciones de esta Tesis Doctoral, y en lo que se refiere especialmente al**

estudio de intervención en humanos, se deberá prestar especial atención en conseguir aumentar el número de participantes y en conseguir introducir en el estudio un grupo placebo. Estos estudios clínicos serán necesarios si se quiere finalmente comercializar el hidrolizado de clara de huevo con estas propiedades.

## CONCLUSIONS

The results obtained in this Doctoral Thesis lead us to the following conclusions:

1. The diet induced obesity animal model in which most of the alterations related with metabolic syndrome were developed is the experimental model that received a high fat diet + 25% glucose solution (DGg group) during 20 weeks.
2. The selected model of diet induced obesity (DGg) showed, among other alterations, a significant increase of body weight, waist circumference and adipocyte size from epididymal adipose tissue. These animals developed additionally an early stage of insulin resistance combined with sensory neuropathy and an increase of oxidative stress and inflammatory biomarkers. The results observed in brown adipose tissue showed besides a worsening of the mitochondrial repair and biogenesis in these animals.
3. Administration from 9<sup>th</sup> week until the end of the study (20<sup>th</sup> week) of 1 g/kg-day of pepsin egg white hydrolysate to high-fat-high-glucose selected model (DGgH group) showed the following activities:
  - a. Lowering body weight gain, waist circumference and adipocytes size from epididymal adipose tissue.
  - b. Reducing plasma malondialdehyde levels, plasma antioxidant capacity and to normalize liver levels of reduced glutathione.
  - c. Decreasing of the plasma hyperglycemia and hyperinsulinemia, as well as a reversion of the peripheral neuropathy.
  - d. Enhancing expression of oxidative genes such as PPAR $\alpha$ , Mcad, Lcad and Cpt1B, overexpression of genes related with mitochondrial biogenesis PGC1 $\beta$ , MFN2, Tfb2m, and increased mitochondrial amount in brown adipose tissue. Overexpression of thermogenic genes UCP1 and PRDm16 in brown adipose tissue.

4. Administration of 1 g/kg·day of pepsin egg white hydrolysate from week 9<sup>th</sup> until the end of the study to the control group (CH group) did not cause significant changes compared with control group that did not received the hydrolysate (C group)
5. Daily administration of 4 g pepsin egg white hydrolysate during 12 weeks did not cause adverse effects during the clinical trial in any volunteer. Thus pepsin egg white hydrolysate can be considered as safe for human consumption.
6. Daily administration of 4 g pepsin egg white hydrolysate during 12 weeks improved some of the cardiometabolic alterations evaluated during the clinical trial in those subjects, which showed alterations in those parameters. Reduction in body weight or waist circumference was not observed, although all the selected patients showed those parameters increased.

**Regarding the results obtained in this Doctoral Thesis, pepsin egg white hydrolysate could be used as ingredient to develop functional foods useful for the prevention and/or treatment of some alterations related to obesity and/or metabolic syndrome development. However, more studies would be necessary to deepen and clarify the pathways by which the hydrolysate exerts its physiological activity, and to demonstrate clearly its beneficial effects on human subjects. However, this Doctoral Thesis has some limitations, specifically, regarding the clinical trial performed, an increased number of volunteers and the presence of a placebo group would be of special importance, and more clinical trials will be necessary in order to commercialize the pepsin egg white hydrolysate.**

# BIBLIOGRAFÍA

## A

**Abbasian M., Delvarianzadeh M., Ebrahimi H., Khosravi F. y Nourozi P. (2018).** Relationship between serum levels of oxidative stress and metabolic syndrome components. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. DOI: 10.1016/j.dsx.2018.03.015.

**Agencia Española de Seguridad Alimentaria (2005).** Invertir la tendencia de la obesidad: Estrategia para la nutrición, actividad física y prevención de la obesidad (Estrategia NAOS). Madrid: Coiman S. L.

**Aggett P. J., Antoine J. M., Asp N. G., Bellise F., Contor L., Cummings J. H., Howlett J., Müller D. J. G., Persin C., Pijls L. T. J., Rechkemmer G., Tuijelaars S. y Verhagen H. (2005).** PASSCLAIM Consensus on Criteria. *European Journal of Nutrition* 44: 1/5-1/30.

**Aguilar-Valles A., Inoue W., Rummel C. y Luheshi G. N. (2015).** Obesity, adipokines and neuroinflammation. *Neuropharmacology* 96: 124-134.

**Aldiss P., Betts J., Sale C., Pope M., Budge H. y Symons M. E. (2018).** Exercise-induced "browning" of adipose tissues. *Metabolism* 81: 63-70.

**Andersen C. J. y Fernandez M. L. (2013).** Dietary strategies to reduce metabolic syndrome. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 14: 241-254.

**Aslam M. y Madhu S. V. (2017).** Development of metabolic syndrome

in high-sucrose diet fed rats is not associated with decrease in adiponectin levels. *Endocrine* 58: 59-65.

**Assifi M. M. y Eibl G. (2012).** Western diet-induced pancreatic cancer. En: S. Shankar y R. Srivastava (Eds.). *Nutrition, Diet and Cancer* (pp. 327-338). Dordrecht: Springer Science+Business Media B.V.

**Avelar T. M. T., Storch A. S., Castro L. A., Azevedo G. V. M. M., Ferraz L. y Lopes P. F. (2015).** Oxidative stress in the pathophysiology of metabolic syndrome: which mechanisms are involved? *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 51: 231-239.

**Ayala A., Muñoz M. F. y Argüelles S. (2014).** Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. DOI: 10.1155/2014/360438.

**Aydin S., Aksoy A., Aydin S., Kalayci M., Yilmaz M., Kuloglu T., Citil C. y Catak Z. (2014).** Today's and yesterday's of pathophysiology: Biochemistry of metabolic syndrome and animal models. *Nutrition* 30: 1-9.

## B

**Badimon L. y Cubedo J. (2017).** Adipose tissue depots and inflammation: Effects on plasticity and resistant mesenchymal stem cell function. *Cardiovascular Research* 113: 1064-1073.

- Baláž M. (2014).** Eggshell membrane biomaterial as a platform for applications in materials science. *Acta Biomaterialia* 10: 3827-3843.
- Ballmer-Weber B. K., Brockow K., Fiocchi A., Theler B., Vogel L., Ring J., Szépfalusi Z., Mazzina O., Schaller R., Fritsché R., Vissers Y. M. y Nutten S. (2016).** Hydrolysed egg displays strong decrease in allergenicity and is well tolerated by egg-allergic patients. *Allergy* 71: 728-732.
- Bao Z. J., Zhao Y., Wang X. Y. y Chi Y. J. (2017).** Effects of degree of hydrolysis (DH) on the functional properties of egg yolk hydrolysate with alcalase. *Journal of Food Science and Technology* 54: 669-678.
- Barone M., Viggiani M. T., Avolio A. W., Iannone A., Rendina M. y Di Leo A. (2017).** Obesity as predictor of postoperative outcomes in liver transplant candidates: Review of the literature and future perspectives. *Digestive and Liver Disease* 49: 957-966.
- Barrios-Ramos J. P., Garduño-Siciliano I., Loredó-Mendoza M. L., Chamorro-Cevallos G., Jaramillo-Flores M. E., Madrigal-Bujaidar E. y Álvarez-Bonzález I. (2014).** A quick model for the induction of metabolic syndrome markers in rats. *Internal Medicine*. DOI: 10.4172/2165-8048.1000137.
- Bhatti J. S., Bhatti G. K. y Reddy P. H. (2017).** Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders – A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta* 1863: 1066-1077.
- Bibiloni M. M., Fernández-Blanco J., Pujol-Plana N., Martín-Galindo N., Fernández-Vallejo M. M., Roca-Domingo M., Chamorro-Medina J. y Tur J. A. (2017).** Mejora de la calidad de la dieta y del estado nutricional en población infantil mediante un programa innovador de educación nutricional: INFADIMED. *Gaceta Sanitaria*. DOI: 10.1016/j.gaceta.2016.10.013.
- Black L., Matvienko-Sikar K. y Kearney P. M. (2017).** The association between childcare arrangements and risk of overweight and obesity in childhood: a systematic review. *Obesity Reviews* 18: 1170-1190.
- Bonet M. L., Mercader J., Palou A. (2017).** A nutritional perspective on UCP1-dependent thermogenesis. *Biochimie* 134: 99-117.
- Bonomini F., Rodella L. F. y Rezzani R. (2015).** Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress. *Aging and Disease* 6: 109-120.
- Boulinguez A., Staels B., Duez H. y Lancel S. (2017).** Mitochondria and endoplasmic reticulum: Targets for a better insulin sensitivity in skeletal muscle? *Biochimica et Biophysica Acta* 1862: 901-916.
- Brigelius-Flohé R., Maiorino M. (2013).** Glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1830: 3289-3303.
- Brown L., Caligiuri S. P. B., Brown D. y Pierce G. N. (2018).** Clinical trials using functional foods provide unique challenges. *Journal of Functional Foods* 45: 233-238.

**Brown L., Poudyal H. y Panchal S. K. (2015).** Functional foods as potential therapeutic options for metabolic syndrome. *Obesity reviews* 16: 914-941.

**Byun M. S., Yu O. K., Cha Y. S. y Park T. S. (2016).** Korean traditional Chungkookjang improves body composition, lipid profiles and atherogenic indices in overweight/obese subjects: a double-blind, randomized, crossover, placebo-controlled clinical trial. *European Journal of Clinical Nutrition* 70: 1116-1122.

## C

**Cabezos P. A., Vera G., Martín-Fontelles M. I., Fernández-Pujol R. y Abalo R. (2010).** Cisplatin-induced gastrointestinal dysmotility is aggravated after chronic administration in the rat. Comparison with pica. *Neurogastroenterology & Motility* 22: 797-805.

**Carbajal A. y Ortega R. (2011).** La dieta mediterránea como modelo de dieta prudente y saludable. *Revista Chilena de Nutrición* 28: 224-236.

**Carrillo W., Gómez-Ruiz J. A., Miralles B., Ramos M., Barrio D. y Recio I. (2016).** Identification of antioxidant peptides of hen egg-white lysozyme and evaluation of inhibition of lipid peroxidation and cytotoxicity in the zebrafish model. *European Food Research and Technology* 242: 1777-1785.

**Castro J. P., Grune T. y Speckmann B. (2016).** The two faces of reactive oxygen species (ROS) in adipocyte

function and dysfunction. *Biological Chemistry* 397: 709-724.

**Chay Pak Ting B. P., Mine Y., Juneja L. R., Okubo T., Gauthier S. F. y Pouliot Y. (2011).** Comparative composition and antioxidant activity of peptide fractions obtained by ultrafiltration of egg yolk protein enzymatic hydrolysates. *Membranes* 6: 149-161.

**Chen C. y Chi Y. J. (2012).** Antioxidant, ACE inhibitory activities and functional properties of egg white protein hydrolysate. *Journal of Food Biochemistry* 36: 383-394.

**Cheng H. T., Dauch J. R., Smith G. A., Singleton R. J., Yanik B. M. y Feldman E. L. (2011).** Characterization of intraepidermal nerve fiber morphology in pain associated with diabetic neuropathy and impaired glucose tolerance. *Annals of Neurology* 70: S60-S61.

**CHMP: Committee for medicinal products for human use (2009).** Doc. Ref. CPMP/EWP/238/95 Rev. 3: Guideline on clinical investigation of medicinal products in the treatment of hypertension. Londres: European Medicines Agency.

**Chomczynsky P. y Sacchy N. (1987).** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156-159.

**Claessens M., Calame W., Siemensma A. D., van Baak M. A. y Saris W. H. M. (2009).** The effect of different protein hydrolysate/carbohydrate mixtures on postprandial glucagon and insulin responses in healthy



subjects. *European Journal of Clinical Nutrition* 63: 48-56.

**Cohen J. B. (2017).** Hypertension in obesity and the impact of weight loss. *Current Cardiology Reports* 19: 98.

**Coppey L. J., Gellett J. S., Davidson E. P., Dunlap J. A., Lund D. D. y Yorek M. A. (2001).** Effect of antioxidant treatment of streptozotocin-induced diabetic rats on endoneurial blood flow, motor nerve conduction velocity, and vascular reactivity of epineurial arterioles of the sciatic nerve. *Diabetes* 50: 1927-1937

**Corsello G., Carta M., Marinello R., Picca M., de Marco G., Micillo M., Ferrara D., Vigneri P., Cecere G., Ferri P., Roggero P., Bedogni G., Mosca F., Paparo L., Nocerino R. y Canani R. B. (2017).** Preventive effect of cow's milk fermented with *Lactobacillus paracasei* CBA L74 on common infectious diseases in children: a multicentre randomized controlled trial. *Nutrients* 9: 669.

**Cortez M., Singleton J. R. y Smith A. G (2014).** Glucose intolerance, metabolic syndrome, and neuropathy. *Handbook of Clinical Neurology* 126: 109-22.

## D

---

**Dansen T. B. y Wirtz K. W. A. (2001).** The peroxisome in oxidative stress. *IUBMB Life* 51: 223-230.

**Dávalos A., Miguel M., Bartolomé B. y López-Fandiño R. (2004).** Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic

hydrolysis. *Journal of Food Protection* 67: 1939-1944.

**De Angelis G., Medeghini L., Conte A. M. y Mignardi S. (2017).** Recycling of eggshell waste into low-cost adsorbent for Ni removal from wastewater. *Journal of Cleaner Production* 164: 1497-1506.

**De Campos Zani S. C., Wu J. y Chan C. B. (2018).** Egg and soy-derived peptides and hydrolysates: A review of their physiological actions against diabetes and obesity. *Nutrients* 10: 149.

**De Stefanis D., Mastrocola R., Nigro D., Costelli P. y Aragno M. (2017).** Effects of chronic sugar consumption on lipid accumulation and autophagy in the skeletal muscle. *European Journal of Nutrition* 56: 363-373.

**Delvarianzadeh M., Abbasian M., Khosravi F., Ebrahimi H., Ebrahimi M. H. y Fazli M. (2017).** Appropriate anthropometric indices of obesity and overweight for diagnosis of metabolic syndrome and its relationship with oxidative stress. *Diabetes & Metabolic Syndrome* 115: S907-S911.

**Dissard R., Klein J., Caubet C., Breuil B., Siwy J., Hoffman J., Sicard L., Ducassé L., Rascalou S., Payre B., Buléon M., Mullen W., Mischak H., Tack I., Bascands J. L., Buffin-Meyer B. y Schanstra J. P. (2013).** Long term metabolic syndrome induced by a high fat high fructose diet leads to minimal renal injury in C57BL/6 mice. *Plos One*. DOI: 10.1371/journal.pone.0076703.

**Du K., Markus E., Fecych M., Rhodes J. S. y Beverly J. L. (2017).** Satiety and memory enhancing effects of a high-protein meal depend on the source of protein. *Nutritional Neuroscience* 16: 1-11.

**Dulloo A. G. (2011).** The search for compounds that stimulate thermogenesis in obesity management: from pharmaceuticals to functional food ingredients. *Obesity Reviews* 12: 866-883.

## E

**Eckert E., Zambrowicz A., Pokora M., Polanowski A., Chrzanowska J., Szoltysik M., Dabrowska A., Róžański H. y Trziszka T. (2013).** Biologically active peptides derived from egg proteins. *Bioactive Peptides from Food Proteins* 69: 375-386.

**Eckert E., Zambrowicz A., Pokora M., Setner B., Dąbrowska A., Szoltysik M., Szewczuk Z., Polanowski A., Trziszka T. y Chrzanowska J. (2014).** Egg-yolk protein by-product as a source of ACE-inhibitory peptides obtained with using unconventional proteinase from Asian pumpkin (*Cucurbita ficifolia*). *Journal of Proteomics* 110: 107-116.

**Ellulu M. S. (2017).** Obesity, cardiovascular disease, and role of vitamin C on inflammation: a review of facts and underlying mechanisms. *Inflammopharmacology* 25: 313-328.

**Emanuela F., Grazia M., Marco D. R., Maria Paola L., Giorgio F. y Marco B. (2012).** Inflammation as a link between obesity and metabolic syndrome. *Journal of Nutrition and Metabolism*.

DOI: 10.1155/2012/476380.

**Encuesta Nacional de Salud de España (2017).** Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social, España. <https://www.msssi.gob.es/estadEstudios/estadisticas/encuestaNacional/encuestaNac2017/encuestaResDetall2017.htm>. Visitado en Junio de 2018.

**Engin A. (2017).** Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on preadipocytes and macrophages: hypoxia hypothesis. En A. B. Engin y A. Engin (Eds.). *Obesity and Lipotoxicity* (pp. 305-326). Cham: Springer International Publishing AG.

**Esler M., Lambert G., Schlaich M., Dixon J., Sari C. I. y Lambert E. (2018).** Obesity paradox in hypertension. Is this because sympathetic activation in obesity-hypertension takes a benign form? *Hypertension* 71: 22-33.

**Evert A. B., Boucher J. L., Cypress M., Dunbar S. A., Franz M. J., Mayer-Davis E. J., Neumiller J. J., Nwankwo R., Verdi C. L., Urbanski P. y Yanci W. S. (2014).** Nutrition therapy recommendations for the management of adults with diabetes. *Diabetes Care* 37: S120-S143.

## F

**Fasshauer M. y Blüher M. (2015).** Adipokines in health and disease. *Trends in Pharmacological Science* 36: 461-470.

**Ferrannini E. y Mari A. (1998).** How to measure insulin sensitivity. *Journal of Hypertension* 16: 895-906.

**Ferrannini G., Namwanje M., Fang B., Damle M., Li D., Liu Q., Lazar M. A. y Qiang L. (2016).** Genetic backgrounds determine brown remodeling of white fat in rodents. *Molecular Metabolism* 10: 948-958.

**Fossati P. y Prencipe L. (1982).** Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clinical Chemistry* 28: 2077-2080.

**Fox A., Kesingland A., Gentry C., McNair K., Patel S., Urban L. y James I. (2001).** The role of central and peripheral cannabinoid receptors in the antihyperalgesic activity of cannabinoids in a model of neuropathic pain. *Pain* 92: 91-100.

**Fujita H., Usui H., Kurahashi K. y Yoshikawa M. (1995).** Isolation and characterization of ovokinin, a bradykinin B1 agonist peptide derived from ovalbumin. *Peptides* 16: 785-790.

**Fujita H., Yokoyama K. y Yoshikawa M. (2000).** Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins. *Journal of Food Science* 65: 564-569.

**Furuhashi M., Saitoh S., Shimamoto K. y Miura T. (2014).** Fatty acid-binding protein 4 (FABP4): Pathophysiological insights and potent clinical biomarker of metabolic and cardiovascular diseases. *Clinical Medicine Insights: Cardiology* 8(S3): 23-33.

---

## G

---

**Galicía Martín I. y Simal Antón A. (2002).** Tratamiento farmacológico de la obesidad. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud* 26: 117-127.

**Galleano M., Calabro V., Prince P. D., Litterio M. C., Piotrkowski B., Vazquez-Prieto M. A., Miatello R. M., Oteiza P. I. y Fraga C. G. (2012).** Flavonoids and metabolic syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1259: 87-94.

**Galloway C. y Chattopadhyay M. (2013).** Increases in inflammatory mediators in DRG implicate in the pathogenesis of painful neuropathy in Type 2 Diabetes. *Cytokine* 63: 1-5.

**Garcés Rimón M. (2014).** Hidrolizados de proteínas de huevo como nuevos ingredientes funcionales frente al síndrome metabólico y sus complicaciones. Tesis Doctoral. Directoras: Marta Miguel Castro y Rosina López Fandiño. Universidad Autónoma de Madrid.

**Garcés-Rimón M., González C., Uranga J. A., López-Miranda V., López-Fandiño R. y Miguel M. (2016a).** Pepsin egg White hydrolysate ameliorates obesity-related oxidative stress, inflammation and steatosis in Zucker fatty rats. *Plos One*. DOI: 10.1371/journal.pone.0151193

**Garcés-Rimón M., González C., Vera G., Uranga J. A., López-Fandiño R., López-Miranda V. y Miguel M. (2018).** Pepsin egg White hydrolysate improves glucose metabolism complications related to metabolic

syndrome in Zucker fatty rats. *Nutrients* 10: 441.

**Garcés-Rimón M., López-Expósito I., López-Fandiño R. y Miguel, M. (2016b).** Egg white hydrolysates with in vitro biological multiactivities to control complications associated with the metabolic syndrome. *European Food Research and Technology* 242: 61-69.

**García-Ruiz E., Reynés B., Díaz-Rúa R. Ceresi E., Oliver P. y Palou A. (2015).** The intake of high-fat diets induces the acquisition of brown adipocyte gene expression features in white adipose tissue. *International Journal of Obesity* 39: 1619-1629.

**GBD 2015 Obesity Collaborators (2017).** Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years. *The New England Journal of Medicine* 377: 13-27.

**Giavi S., Vissers Y. M., Muraro A., Lauener R., Konstantinopoulos A. P., Mercenier A., Wermeille A., Lazzarotto F., Frei R., Bonaguro R., Summermatter S., Nutten S. y Papadopoulos N. G. (2016).** Oral immunotherapy with low allergenic hydrolysed egg in egg allergic children. *Allergy* 71: 1575-1584.

**Gibson E. L., Vargas K., Hogan E., Holmes A., Rogers P. J., Wittwer J., Klock J., Goralczyk R. y Mohajeri M. H. (2014).** Effects of acute treatment with a tryptophan-rich protein hydrolysate on plasma aminoacids, mood and emotional functioning in older women. *Psychopharmacology* 231: 4595-4610.

**Görögh T. Quabius E. S., Georgitsis A., Hoffmann M. y Lippross S. (2017).** Sequential activation of the AKT pathway in human osteoblasts treated with Oscarvit: a bioactive product with positive effect both on skeletal pain and mineralization in osteoblast. *BMC Musculoskeletal Disorders* 18: 500.

**Grembecka M. (2015).** Natural sweeteners in a human diet. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny* 66: 195-202.

**Grundy S. M. (2015).** Adipose tissue and metabolic syndrome: too much, too little or neither. *European Journal of Clinical Investigation* 45: 1209-1217.

**Grundy S. M. (2016).** Overnutrition, ectopic lipid and the metabolic syndrome. *Journal of Investigative Medicine* 64: 1082-1086.

## H

**Hafizi Abu Bakar M., Kian Kai C., Wan Hassan W. N. Sarmidi M. R., Yaakob H. y Zaman Huri H. (2015).** Mitochondrial dysfunction as a central event for mechanisms underlying insulin resistance: the roles of long chain fatty acids. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 31: 453-475.

**Han T. S., Correa E., Lean M. E. J., Lee D. M., O'Neill T. W., Bartfal G., Forti G., Giwerzman A., Kula K., Pendleton N., Punab M., Rutter M. K., Vanderschueren D., Huhtaniemi I. T., Wu F. C. W., Casanueva F. F. y EMAS Study Group (2017).** Changes in prevalence of obesity and high waist circumference over four years across

- European regions: the European male ageing study (EMAS). *Endocrine* 55: 456-469.
- Hansel B., Giral P., Nobecourt E., Chantepie S., Bruckert E., Chapman M. J. y Kontush A. (2004).** Metabolic syndrome is associated with elevated oxidative stress and dysfunctional dense high-density lipoprotein particles displaying impaired antioxidative activity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89: 4963-4971.
- Hao L., Lu X., Sun M., Li K., Shen L. y Wu T. (2015).** Protective effects of L-arabinose in high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. *Food & Function Research*. DOI: 10.3402/fnr.v59.28886.
- Harms M. y Seale P. (2013).** Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nature Medicine* 19:1252-1263.
- Hincke M. T., Nys Y., Gautron J., Mann K., Rodriguez-Navarro A. B. y McKee M. D. (2012).** The eggshell: structure, composition and mineralization. *Frontiers in Bioscience* 17: 1266-1280.
- Huang W. Y., Majumder K. y Wu J. (2010a).** Oxygen radical absorbance capacity of peptides from egg white protein ovotransferrin and their interaction with phytochemicals. *Food Chemistry* 123: 635-641.
- Huang W., Shen S., Nimalaratne C., Li S., Majumder K y Wu J. (2012).** Effects of addition of egg ovotransferrin-derived peptides on the oxygen radical absorbance capacity of different teas. *Food Chemistry* 135: 1600-1607.
- Huang X. y Yang Z. (2016).** Resistin's, obesity and insulin resistance: the continuing disconnect between rodents and humans. *Journal of Endocrinological Investigation* 39: 607-615.
- Huang X., Zhou Y., Ma M., Cai Z. y Li T. (2010b).** Chemiluminescence evaluation of antioxidant activity and prevention of DNA damage effect of peptides isolated from soluble eggshell membrane protein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 12137-12142.
- Hull P. (2010).** Glucose Syrups. Technology and Applications. Chichester: Wiley-Blackwell.
- Iannitti T., Graham A. y Dolan S. (2012).** Increased central and peripheral inflammation and inflammatory hyperalgesia in Zucker rat model of leptin receptor deficiency and genetic obesity. *Experimental Physiology* 97: 1236-1245.
- Instituto de Estudios del Huevo (2009).** El gran libro del huevo. León: Editorial Everest S.A.
- International Diabetes Federation (IDF) (2006).** The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. *IDF Communications*.
- Iwaniak A., Darewicz M. y Minkiewicz P. (2018).** Peptides derived from

foods as supportive diet components in the prevention of metabolic syndrome. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 17: 63-81.

---

## J

---

**Jahandideh F., Chakrabarti S., Davidge S. T. y Wu J. (2017).** Egg White hydrolysate shows insulin mimetic and sensitizing effects in 3T3-F442A pre-adipocytes. *Plos One*. DOI: 10.1371/journal.pone.0185653.

**Jahandideh F., Chakrabarti S., Majumder K., Li Q., Panahi S., Morton J. S., Davidge S. T. y Wu J. (2016).** Egg white protein hydrolysate reduces blood pressure, improves vascular relaxation and modifies aortic angiotensin II receptors expression in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Functional Foods* 27: 667-673.

**Jain S. y Anal A. K. (2017).** Production and characterization of functional properties of protein hydrolysates from egg shell membranes by lactic acid bacteria fermentation. *Journal of Food Science and Technology* 54: 1062-1072.

**Jankovic A., Korac A., Buzadzic B., Otasevic V., Stancic A., Daiber A. y Korac B. (2015).** Redox implication in adipose tissue (dys)function-A new look at old acquaintances. *Redox biology* 6: 19-32.

**Jensen G. S. Lenninger M. R., Beaman J. L., Taylor R. y Benson K. F. (2015).** Support of joint function, range of motion, and physical activity levels by consumption of a water-soluble egg

membrane hydrolysate. *Journal of Medicinal Food* 18: 1042-1048.

**Johnston R. D., Stephenson M. C., Crossland H. Cordon S. M., Palcidi E., Cox E. F., Taylor M. A., Aithal G. P. y Macdonald I. A. (2013).** No difference between high-fructose and high-glucose diets on liver triacylglycerol or biochemistry in healthy overweight men. *Gastroenterology* 145: 1016-1025.

**Jornayvaz F. R. y Shulman G. I. (2010).** Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays in Biochemistry* 47: 69-84.

**Jovanović J. R., Stevanović A. B., Žuža M. G., Jakovetić S. M., Šekuljica N. Ž., Bugarski B. M. y Knežević-Jugović Z. D. (2016).** Improvement of antioxidant properties of egg white protein enzymatic hydrolysates by membrane ultrafiltration. *Hemijaska Industrija* 70: 419-428.

---

## K

---

**Kaczmarczyk M. M., Miller M. J. y Freund G. G. (2012).** The health benefits of dietary fiber: Beyond the usual suspects of type 2 diabetes mellitus, cardiovascular disease and colon cancer. *Metabolism Clinical and Experimental* 61: 1058-1066.

**Kamencic H., Lyon A., Paterson P. G. y Juurlink B. H. J. (2000).** Monochlorobimane fluorimetric method to measure tissue glutathione. *Analytical Biochemistry* 286: 35-37.

**Kane A. J., Barker J. E., Mitchell G. M., Theile D. R. B., Romero R., Messina A., Wagh M., Fraulin F. O. G.,**

- Morrison W. A. y Stewart A. (2001).** Inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity promotes ischaemic skin flap survival. *British Journal of Pharmacology* 132:1631-1638.
- Kautzky-Willer A., Harreiter J., y Pacini G. (2016).** Sex and gender differences in risk, pathophysiology and complications of type 2 diabetes mellitus. *Endocrine Reviews* 37: 278-316.
- Kawasaki T., Igarashi K., Koeda T., Sugimoto K., Nakagawa K., Hayashi S., Yamaji R., Inui H., Fukusato T. y Yamanouchi T. (2009).** Rats fed fructose-enriched diets have characteristics of nonalcoholic hepatic steatosis. *The Journal of Nutrition* 139: 2067-2071.
- Kim H. S., Ham J. S., Jeong S. G., Yoo Y. M., Chae H. S., Ahn C. N. y Lee J. M. (2003).** Production of angiotensin-I converting enzyme inhibitory hydrolysates from egg albumen. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 16: 1369-1373.
- König D., Muser K., Berg A. y Deibert P. (2012).** Fuel selection and appetite-regulating hormones after intake of a soy protein-based meal replacement. *Nutrition* 28: 35-39.
- König D., Oesser S., Scharla S., Zdzieblik D. y Gollhofer A. (2018).** Specific collagen peptides improve bone mineral density and bone markers in postmenopausal women—a randomized controlled study. *Nutrients* 10: 97.
- Kralisch S., Fasshauer M. (2013).** Adipocyte fatty acid binding protein: a novel adipokine involved in the pathogenesis of metabolic and vascular disease? *Diabetologia* 56: 10-21.
- Kuroda M. y Sakaue H. (2017).** Adipocyte death and chronic inflammation in obesity. *The Journal of Medical Investigation* 64: 193-196.
- Kushner R. F. (2014).** Weight loss strategies for treatment of obesity. *Progress in Cardiovascular Diseases* 56: 465-472.
- Kwon Y. J., Lee H. S. y Lee J. W. (2018).** Association of carbohydrate and fat intake with metabolic syndrome. *Clinical Nutrition* 37: 746-751.
- 
- L
- 
- Lafontan M. (2014).** Adipose tissue and adipocyte dysregulation. *Diabetes & Metabolism* 40: 16-28.
- Lee M., Kovacs-Nolan J., Archbold T., Fan M. Z., Juneja L. R., Okubo T. y Mine Y. (2009).** Therapeutic potential of hen egg White peptides for the treatment of intestinal inflammation. *Journal of Functional Foods* 1: 161-169.
- Lee Y. H., Mottillo E. P. y Granneman J. G. (2014).** Adipose tissue plasticity from WAT to BAT and in between. *Biochimica et Biophysica Acta* 1842: 358-369.
- Liang J., Pei X., Zhang Z., Wang N., Wang J. y Li Y. (2010).** The protective effects of long-term oral administration of marine collagen hydrolysate from chum salmon on collagen matrix homeostasis in the chronological aged skin of Sprague-Dawley male rats. *Journal of Food*

- Science*. DOI : 10.1111/j.1750-3841.2010.01782.x.
- Liao W., Jahandideh F., Fan H., Son M. y Wu J. (2018).** Egg protein-derived bioactive peptides: Preparation, efficacy and absorption. *Advances in Food and Nutrition Research* 85: 1-58.
- Li-Chan E. C. Y. y Kim H. O. (2008).** Structure and chemical composition of eggs. En Y. Mine (Eds.). *Egg bioscience and biotechnology* (pp. 1-95). Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.
- Lind M., Hayes A., Caprnda m., Petrovic K., Rodrigo L., Kruzliak P. y Zulli A. (2017).** Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? *Biomedicine & Pharmacotherapy* 93: 370-375.
- Liu J., Ju Z., Zhao W., Lin S., Wang E., Zhang Y., Hao H., Wang W. y Chen F. (2010).** Isolation and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from egg white protein hydrolysates. *Food Chemistry* 122: 1159-1163.
- Liu Y. F., Oey I., Bremer P., Carne A. y Silcock P. (2017).** Bioactive peptides derived from egg proteins: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 13: 1-23.
- Livak K. J. y Schmittgen T. D. (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25: 402-408.
- Lopes H. F., Corrêa-Giannella M. L., Consolim-Colombo F. M. y Egan B. M. (2016).** Visceral adiposity syndrome. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 8: 40.
- López-Miranda V., Soto-Montenegro M. L., Uranga-Ocio J. A., Vera G., Herradón E., González C., Blas C., Martínez-Villaluenga M., López-Pérez A. E., Desco M. y Abalo R. (2015).** Effects of chronic dietary exposure to monosodium glutamate on feeding behavior, adiposity, gastrointestinal motility, and cardiovascular function in healthy adult rats. *Neurogastroenterology & Motility* 27: 1559-1570.
- Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. y Randall R. J. (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Luo L. y Liu M. (2016).** Adipose tissue in control of metabolism. *Journal of Endocrinology* 231: R77-R99.
- Lupachyk S., Watcho P., Hasanova N. Julius U. y Obrosova I. G. (2012).** Triglyceride, nonesterified fatty acids, and prediabetic neuropathy: role for oxidative-nitrosative stress. *Free Radical Biology & Medicine* 52: 1255-1263.

---

## M

---

- Machado M. V., Vieira A. B., Gomes da Conceição F., Rodrigues Nascimento A., da Nóbrega A. C. L. y Tibirica E. (2017).** Exercise training dose differentially alters muscle and heart capillary density and metabolic functions in an obese rat with metabolic syndrome. *Experimental Physiology* 102: 1716-1728.



- Maithilikarpagaselvi N., Sridhar M. G., Swaminathan R. P. Zachariah B. (2016).** Curcumin prevents inflammatory response, oxidative stress and insulin resistance in high fructose fed male Wistar rats: Potential role of serine kinases. *Chemico-Biological Interactions* 244: 187-194.
- Majumder K., Liang G., Chen Y., Guan L., Davidge S. T. y Wu J. (2015).** Egg ovotransferrin-derived ACE inhibitory peptide IRW increases ACE2 but decreases proinflammatory genes expression in mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats. *Molecular Nutrition & Food Research* 59: 1735-1744.
- Majumder K. y Wu J. (2009).** Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from simulated in vitro gastrointestinal digestion of cooked eggs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 471-477.
- Malik V. S., Schulze M. B. y Hu F. B. (2006).** Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: a systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition* 84: 274-288.
- Malone J. I. (2016).** Diabetic Central Neuropathy: CNS Damage Related to Hyperglycemia. *Diabetes* 65: 355-357
- Manso M. A., Miguel M., Even J., Hernández R., Aleixandre A. y López-Fandiño R. (2008).** Effect of the long-term intake of an egg White hydrolysate on the oxidative status and blood lipid profile of spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry* 109: 361-367.
- Marcotorchino J., Tourniaire F., Astier J., Karkeni E., Canault M., Amiot M. J., Bendahan D., Bernard M., Martin J. C., Giannesini B. y Landrier J. F. (2014).** Vitamin D protects against diet-induced obesity by enhancing fatty acid oxidation. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 25: 1077-1083.
- Markus C. R., Verschoor E., Firk C., Kloek J. and Gerhardt C. C. (2010).** Effect of tryptophan-rich egg hydrolysate on brain tryptophan availability, stress and performance. *Clinical Nutrition* 29: 610-616.
- Marseglia L., Manti S., D'Angelo G., Nicotera A., Parisi E., Di Rosa G., Gitto E. y Arrigo T. (2015).** Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 19: 378-700.
- Martinez, C. S. (2017).** Efeitos da exposição ao alumínio sobre parâmetros neurológicos, reprodutores, cardiovasculares e bioquímicos em ratos. Tesis Doctoral. Directora: Giulia Alessandra Wiggers Peçanha. Universidade Federal do Pampa.
- Martins Pereira R., Botezelli J. D., da Cruz Rodrigues K. C. Mekary R. A., Cintra C. E., Pauli J. R., da Silva A. S. R., Ropelle E. R. y de Moura L. P. (2017).** Fructose consumption in the development of obesity and effects of different protocols of physical exercise on the hepatic metabolism. *Nutrients* 9: 405.
- Mastrocola R., Nigro D., Chiazza F., Medana C., Dal Bello., Boccuzzi G., Collino M. y Aragno M. (2016).**

- Fructose-derived advanced glycation end-products drive lipogenesis and skeletal muscle reprogramming via SREBP-1c dysregulation in mice. *Free Radical Biology and Medicine* 91: 224-235.
- Matoba N., Usui H., Fujita H. y Yoshikawa M. (1999).** A novel anti-hypertensive peptide derived from ovalbumin induces nitric oxide-mediated vasorelaxation in an isolated SHR mesenteric artery. *FEBS Letters* 452: 181-184.
- Mayas M. D., Ortega F. J., Gómez-Huelgas R., Roca N., Fernández-Real J. M. y Tinahones F. J. (2009).** Decrease in FASN expression in adipose tissue of hypertensive individuals. *American Journal of Hypertension* 22: 1258-1262.
- Mayas M. D., Ortega F. J., Macías-González M., Bernal R., Gómez-Huelgas R., Fernández-Real J. M. y Tinahones F. J. (2010).** Inverse relation between FASN expression in human adipose tissue and the insulin resistance level. *Nutrition & Metabolism*. DOI: 10.1186/1743-7075-7-3.
- McMurray F., Patten D. A. y Harper M. E. (2016).** Reactive oxygen species and oxidative stress in obesity - Recent findings and empirical approaches. *Obesity* 24: 2301-2310.
- Meiattini F., Prencipe L., Bardelli F., Giannini G. y Tarli P. (1978).** The 4-hydroxybenzoate/4-aminophenazone chromogenic system used in the enzymic determination of serum cholesterol. *Clinical Chemistry* 24: 161-165.
- Mendis E., Rajapakse N. y Kim S. K. (2005).** Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 581-587.
- Miguel M. y Aleixandre A. (2006).** Antihypertensive peptides derived from egg proteins. *The Journal of Nutrition* 136: 1457-1460.
- Miguel M., Alvarez Y., López-Fandiño R., Alonso M. J. y Salices M. (2007a).** Vasodilator effects of peptides derived from egg white proteins. *Regulatory Peptides* 140:131-135.
- Miguel M., López-Fandiño R., Ramos M. y Aleixandre A. (2005).** Short-term effect of egg-white hydrolysate products on the arterial blood pressure of hypertensive rats. *British Journal of Nutrition* 94: 731-737.
- Miguel M., López-Fandiño R., Ramos M. y Aleixandre A. (2006).** Long-term intake of egg white hydrolysate attenuates the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences* 78: 2960-2966.
- Miguel M., Manso M. A., Martín-Álvarez P. J., Aleixandre A. y López-Fandiño R. (2007b).** Antiotensin-converting enzyme activity in plasma and tissues of spontaneously hypertensive rats after the short- and long-term intake of hydrolysed egg white. *Molecular Nutrition and Food Research* 51: 555-563.
- Miguel M., Recio I., Gómez-Ruiz J. A., Ramos M. y López-Fandiño R. (2004).**

Antiotensin I-Converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Protection* 67: 1914-1920.

**Monsanto S. P., Hintze K. J., Ward R. E., Larson D. P., Lefevre M. y Benninghoff A. D. (2016).** The new total Western diet for rodents does not induce an overweight phenotype or alter parameters of metabolic syndrome in mice. *Nutrition Research* 36: 1031-1044.

**Moreno-Fernández S., Garcés-Rimón M., González C., Uranga J. A., López-Miranda V., Vera G. y Miguel M. (2018).** Pepsin egg White hydrolysate ameliorates metabolic síndrome in high-fat/high-dextrose fed rats. *Food & Function* 9: 78-86.

**Motta V. F., Bargut T. L., Aguila M. B. y Mandarin-de-Lacerda C. A. (2017).** Treating fructose-induced metabolic changes in mice with high-intensity interval training: insights in the liver, white adipose tissue, and skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* 123: 699-709.

**Moughan P. J., Rutherford S. M., Montoya C. A. y Dave L. A. (2014).** Food-derived bioactive peptides – a new paradigm. *Nutrition Research Reviews* 27: 16-20.

**Muka T., Blekkenhorst L. C., Lewis J. R., Prince R. L., Erler N. S., Hofman A., Franco O. H., Rivadeneira F. y Kiefte-de Jong J. C. (2017).** Dietary fat composition, total body fat and regional body fat distribution in two Caucasian populations of middle-aged and older adult women. *Clinical Nutrition* 36: 1411-1419.

**Myers K. P. (2017).** Sensory-specific satiety is intact in rats made obese on a high-fat high-sugar choice diet. *Appetite* 112: 196-200.

---

## N

---

**Naito H. K. y David J. A. (1984).** Laboratory considerations: Determination of cholesterol, triglyceride, phospholipid, and other lipids in blood and tissues. *Laboratory and Research Methods in Biology and Medicine* 10: 1-76.

**Nakamura K., Fuster J. J. y Walsh K. (2014).** Adipokines: A link between obesity and cardiovascular disease. *Journal of Cardiology* 63: 250-259.

**Nimalaratne C., Bandara N. y Wu J. (2015).** Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed chicken egg white. *Food Chemistry* 188: 467-472.

**Nishimoto Y., Nakajima S., Tateya S., Saito M., Ogawa W. y Tamori Y. (2017).** Cell death-inducing DNA fragmentation factor A-like effector A and fat-specific protein 27β coordinately control lipid droplet size in brown adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 292: 10824-10834.

**Nishimoto Y. y Tamori Y. (2017).** CIDE family-mediated unique lipid droplet morphology in white adipose tissue and brown adipose tissue determines the adipocyte energy metabolism. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 24: 989-998.

## O

**Ochiai M. y Matsuo T. (2014).** Effect of egg white and its hydrolysate on stearoyl-CoA desaturase index and fat accumulation in rat tissues. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 65: 948-952.

**Ochiai M., Misaki K., Takeuchi T., Narumi R., Azuma Y. y Matsuo T. (2017).** Egg white hydrolysate can be a low-allergenic food material to suppress ectopic fat accumulation in rats fed an equicaloric diet. *Journal of Nutritional Sciences and Vitaminology* 63: 111-119.

**Oltman C. L., Davidson E. P., Coppey L. J., Kleinschmidt T. L., Lund D. D. y Yorek M. A. (2008).** Attenuation of vascular/neural dysfunction in Zucker rats treated with enalapril or rosuvastatin. *Obesity* 16: 82-89.

**Ou B. X., Hampsch-Woodill M. y Prior R. L. (2001).** Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 4619-4626.

## P

**Pahlavani M., Ramalho T., Koboziev I., LeMieux M. J., Jayarathne S., Ramalingam L., Filgueiras L. R. y Moustaid-Moussa N. (2017).** Adipose tissue inflammation in insulin resistance: review of mechanisms mediating anti-inflammatory effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Journal of Investigative Medicine* 65: 1021-1027.

**Palmer B. F. y Clegg D. J. (2017).** Non-shivering thermogenesis as a mechanism to facilitate sustainable weight loss. *Obesity Reviews* 18: 819-831.

**Panchal S. K. y Brown L. (2011).** Rodent models for metabolic syndrome research. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. DOI: 10.1155/2011/351982.

**Panchal S. K., Poudyal G., Iyer A. Nazer R., Alam A., Diwan V., Kauter K., Sernia C., Campbell F., Ward L., Gobe G., Fenning A. y Brown L. (2011).** High-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 57: 611-624.

**Park S., Choi K. S., Lee D., Kim D., Lim K. T., Lee K. H. Seonwoo H. y Kim J. (2016).** Eggshell membrane: Review and impact on engineering. *Biosystems Engineering* 151: 446-463.

**Park P. J., Jung W. K., Nam K. S., Shahidi F. y Kim S. K. (2001).** Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 78: 651-656.

**Pavlovic J. M., Vieira J. R., Lipton R. B y Bond D. S. (2017).** Association between obesity and migraine in women. *Current Pain and Headache Reports* 21: 41.

**Peña García-Orea G., Heredia Elvar J. R., Donate F. I., Moral S., Mata F. y Segarra Núñez V. (2013).** Sarcopenia,

obesidad sarcopénica y papel del ejercicio físico. *PubliCE Standard*.

**Pereira-da-Silva L., Rêgo C. y Pietrobelli A. (2016).** The diet of preschool children in the Mediterranean counties of the European Union: A systematic review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*.

DOI: 10.3390/ijerph13060572.

**Pérez-López F. R., Chedraui P., Haya J. y Cuadros J. L. (2009).** Effects of the Mediterranean diet on longevity and age-related morbid conditions. *Maturitas* 64: 67-79.

**Peterson G. L. (1979).** Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosenbrough, Farr and Randall. *Analytical Biochemistry* 100: 201-220.

**Plat J., Severins N., Morrison S. y Mensink R. P. (2017).** Effects of NWT-03, an egg-protein hydrolysate, on blood pressure in normotensive, high-normotensive and mild-hypertensive men and women: a dose-finding study. *British Journal of Nutrition* 117: 942-950.

**Poudyal H., Panchal S. y Brown L. (2010).** Comparison of purple carrot juice and  $\beta$ -carotene in a high-carbohydrate, high-fat diet-fed rat model of the metabolic syndrome. *British Journal of Nutrition* 104: 1322-1332.

**Pucci G., Alcidi R., Tap L., Battista F., Mattace-Raso F. y Schillaci G. (2017).** Sex- and gender-related prevalence, cardiovascular risk and therapeutic approach in metabolic syndrome: a

review of the literature. *Pharmacological Research* 120: 34-42.

**Putakala M., Gujjala S., Nukala S. y Desireddy S. (2017).** Beneficial effects of *Phyllanthus amarus* against high fructose diet induced insulin resistance and hepatic oxidative stress in male wistar rats. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 183: 744-764.

---

## R

**Raimundo M. y Lopes J. A. (2011).** Metabolic syndrome, chronic kidney disease, and cardiovascular disease: a dynamic and life-threatening triad. *Cardiology Research and Practice*. DOI: 10.4061/2011/747861.

**Rakhshandehroo M., Knoch B., Müller M. y Sander K. (2010).** Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *PPAR Research*. DOI: 10.1155/2010/612089.

**Rao S., Ju T., Sun J., Su Y., Xu R. y Yan Y. (2012a).** Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from enzymatic hydrolysate of hen egg white lysozyme. *Food Research International* 46: 127-134.

**Rao S., Sun J., Liu Y., Zeng H., Su Y. y Yang Y. (2012b).** ACE inhibitory peptides and antioxidant peptides derived from in vitro digestion hydrolysate of hen egg white lysozyme. *Food Chemistry* 135: 1245-1252.

**Raposo L., Severo M., Barros H. y Santos A. C. (2017).** The prevalence of the metabolic syndrome in

- Portugal: the PORMETS study. *BMC Public Health* 17: 555.
- Ratliff J., Leite J. O., de Ogburn R., Puglisi M. J., VanHeest J. y Fernandez M. L. (2010).** Consuming eggs for breakfast influences plasma glucose and ghrelin, while reducing energy intake during the next 24 hours in adult men. *Nutrition Research* 30: 96-103.
- Reagan-Shaw S., Nihal M. y Ahmad N. (2007).** Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB Journal* 22: 659-661.
- Reglamento (CE) Nº1924/2006** del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de Diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y propiedades saludables de los alimentos.
- Requena T., Miguel M., Garcés-Rimón M., Martínez-Cuesta M. C., López-Fandiño R. y Peláez C. (2017).** Pepsin egg White hydrolysate modulates gut microbiota in Zucker obese rats. *Food & Function* 8: 437-443.
- Ribeiro Vieira C., Ribeiro de Oliveira Lomeu F. L., de Castro Moreira M. E., Stampini Duarte Martino H. y Ribeiro Silva R. (2017).** Clinical application of a cocoa and unripe banana flour beverage for overweight women with abdominal obesity: Prospective, double-blinded and randomized clinical trial. *Journal of Food Biochemistry*. DOI: 10.1111/jfbc.12372.
- Rippe J. M y Angelopoulos T. J. (2016a).** Relationship between added sugars consumption and chronic disease risk factors: Current understanding. *Nutrients* 8: 697.
- Rippe J. M. y Angelopoulos T. J. (2016b).** Sugars, obesity, and cardiovascular disease: results from recent randomized control trials. *European Journal of Nutrition* 55: S45-S53.
- Rizzetti D. A., Altermann C. D. C., Martinez C. S., Peçanha F. M., Vassallo D. V., Uranga-Ocio J. A., Miguel Castro M., Wiggers G. A. y Mello-Carpes P. B. (2016a).** Ameliorative effects of egg White hydrolysate on recognition memory impairments associated with chronic exposure to low mercury concentration. *Neurochemistry International* 101: 30-37.
- Rizzetti D. A., Fernandez G., Moreno S., Uranga Ocio J. A., Peçanha F. M., Vera G., Vassallo D. V., Miguel Castro M. y Wiggers G. A. (2016b).** Egg White hydrolysate promotes neuroprotection for neuropathic disorders induced by chronic exposure to low concentrations of mercury. *Brain Research* 1646: 482-489.
- Rizzetti D. A., Martín A., Corrales P., Fernández F., Simões M. R., Peçanha F. M., Vassallo D. V., Miguel M. y Wiggers G. A. (2017a).** Egg White-derived peptides prevent cardiovascular disorders induced by mercury in rats: Role of angiotensin-converting enzyme (ACE) and NADPH oxidase. *Toxicology Letters* 281: 158-174.
- Rizzetti D. A., Martinez C. S., Escobar A. G., da Silva T. M., Uranga-Ocio J. A., Peçanha F. M., Vassallo D. V.,**

- Miguel Castro M. y Wiggers G. A. (2017b).** Egg White-derived peptides prevent male reproductive dysfunction induced by mercury in rats. *Food and Chemical Toxicology* 100: 253-264.
- Robinson E. (2017).** Overweight but unseen: a review of the underestimation of weight status and a visual normalization theory. *Obesity Reviews* 18: 1200-1209.
- Rochlani Y., Pothineni N. V., Kovelamudi S. y Mehta J. L. (2017).** Metabolic syndrome: Pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease* 11: 215-225.
- Rodríguez A., Rodríguez M., Córdoba J. J. y Andrade M. J. (2015).** Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. *Methods in Molecular Biology* 1275: 31-56.
- Rodriguez-Martinez M. A. y Ruiz-Torres A. (1992).** Homeostasis between lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in healthy human aging. *Mechanisms of Ageing and Development* 66: 213-222.
- Ruff K. J., Winkler A., Jackson R. W., DeVore D. P. y Ritz B. W. (2009).** Eggshell membrane in the treatment of pain and stiffness from osteoarthritis of the knee: a randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled clinical study. *Clinical Rheumatology* 28: 907-914.
- Rühl R. y Landrier J. F. (2016).** Dietary regulation of adiponectin by direct and indirect lipid activators of nuclear hormone receptors. *Molecular Nutrition and Food Research* 60: 175-184.
- 
- S**
- 
- Sah S. P., Singh B. y Choudhary S. (2016).** Animal models of insulin resistance: A review. *Pharmacology Reports* 68: 1165-1177.
- Sánchez-Delgado G., Martinez-Tellez B., Olza J., Aguilera C. M., Gil A., Ruiz J. R. (2015).** Role of exercise in the activation of Brown adipose tissue. *Annals of Nutrition and Metabolism* 67:21-32.
- Santana A., Melo A., Tavares T. y Ferreira I. M. P. L. V. O. (2016).** Biological activities of peptide concentrates obtained from hydrolysed eggshell membrane byproduct by optimisation with response surface methodology. *Food & Function* 7: 4597-4604.
- Santos-Hernández M., Miralles B., Amigo L. y Recio I. (2018).** Intestinal Signalling of proteins and digestion-derived products relevant to satiety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b02355.
- Scheele C. y Nielsen S. (2017).** Metabolic regulation and the anti-obesity perspectives of human brown fat. *Redox Biology* 12: 770-775.
- Schrover I. M., Spiering W., Leiner T. y Visseren F. L. J. (2016).** Adipose tissue dysfunction: clinical relevance and diagnostic possibilities. *Hormone and Metabolic Research* 48: 213-225.

- Seo D. C., Choe S. y Torabi M. R. (2017).** Is waist circumference  $\geq 102/88$  cm better than body mass index  $\geq 30$  to predict hypertension and diabetes development regardless of gender, age group, and race/ethnicity? Meta-analysis. *Preventive Medicine* 97: 100-108.
- Seravalle G. y Grassi G. (2017).** Obesity and hypertension. *Pharmacological Research* 122: 1-7.
- Seyssel K., Meugnier E., Lê K. A., Durand C., Disse E., Blond E., Pays L., Nataf S., Brozek J., Vidal H., Tappy L. y Laville M. (2016).** Fructose overfeeding in first-degree relatives of type 2 diabetic patients impacts energy metabolism and mitochondrial functions in skeletal muscle. *Molecular Nutrition and Food Research* 60: 2691-2699.
- Sharma N., Okere I. C., Barrows B. R., Lei B., Duda M. K., Yuan C. L., Previs S. F., Sharov V. G., Azimzadeh A. M., Ernsberger P., Hoit B. D., Sabbah H. y Stanley W. C. (2008).** High-sugar diets increase cardiac dysfunction and mortality in hypertension compared to low-carbohydrate or high-starch diets. *Journal of Hypertension* 26:1402-1410.
- Shawky N. M., Hehatou G. S., Rahim M. A., Suddek G. M. y Gameil N. M. (2014).** Levocetirizine ameliorates high fructose diet-induced insulin resistance, vascular dysfunction and hepatic steatosis in rats. *European Journal of Pharmacology* 740: 353-363.
- Shen S., Chahal B., Majumder K., You S. J. y Wu J. (2010).** Identification of novel antioxidative peptides derived from a thermolytic hydrolysate of ovotransferrin by LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 7664-7672.
- Shi Y., Rupa P., Jiang B. y Mine Y. (2014).** Hydrolysate from eggshell membrane ameliorates intestinal inflammation in mice. *International Journal of Molecular Sciences* 15: 22728-22742.
- Singh R., Barden A., Mori T. y Beilin L. (2001).** Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 44: 129-146.
- Singh P., Sharma P., Sahakyan K. R., Davison D. E., Sert-Kuniyoshi F. H., Romero-Corral A., Swain J. M., Jensen M. D., Lopez-Jimenez F., Kara T. y Somers V. K. (2016).** Differential effects of leptin on adiponectin expression with weight gain versus obesity. *International Journal of Obesity* 40: 266-274.
- Slagter S. N., Corpeleijn E., van der Klauw M. M., Sijtsma A., Swart-Busscher L. G., Perenboom C. W. M., de Vries J. H. M., Feskens E. J. M., Wolffenbuttel B. H. R., Kromhout D. y van Vliet-Ostaptchouk J. V. (2018).** Dietary patterns and physical activity in the metabolically (un)healthy obese: the Dutch lifelines cohort study. *Nutrition Journal*. DOI: 10.1186/s12937-018-0319-0.
- Stino A. M. y Smith A. G. (2017).** Peripheral neuropathy in prediabetes and the metabolic syndrome. *Journal of Diabetes Investigation* 8: 646-655.
- Stolarczyk E. (2017).** Adipose tissue inflammation in obesity: a metabolic



or immune response? *Current Opinion in Pharmacology* 37: 35-40.

**Suliga E., Koziel D. y Głuszek S. (2016).** Prevalence of metabolic syndrome in normal weight individuals. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 23: 631-635.

**Sun S., Chakrabarti S., Fang J., Yin Y. y Wu J. (2016).** Low-molecular-weight fractions of alcalase hydrolyzed egg ovomucin extract exert anti-inflammatory activity in human dermal fibroblast through the inhibition of tumor necrosis factor-mediated nuclear factor  $\kappa$ B pathway. *Nutrition Research* 36: 648-657.

**Sun Z. y Zhang Z. (2005).** Historic perspectives and recent advances in major animal models of hypertension. *Acta Pharmacologica Sinica* 26:295-301.

**Swinburn B. A., Sacks G., Hall K. D., McPherson K., Finegood D. T., Moodie M. L. y Gortmaker S. L. (2011).** The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet* 378: 804-814.

## T

---

**Toledo E., Salas-Salvadó J., Donat-Vargas C., Buil-Cosiales P., Estruch R., Ros E., Corella D., Fitó M., Hu F. B., Arós F., Gómez-Gracia E., Romaguera D., Ortega-Calvo M., Serra-Majem L., Pintó X., Schröder H., Basora J., Sorlí J. V., Bulló M., Serra-Mir M. y Martínez-González M. A. (2015).** Mediterranean Diet and Invasive Breast Cancer Risk Among Women at High Cardiovascular Risk in the PREDIMED Trial: A Randomized Clinical Trial.

*JAMA Internal Medicine* 175: 1752-1760.

**Trayhurn P. (2017).** Origins and early development of the concept that brown adipose tissue thermogenesis is linked to energy balance and obesity. *Biochimie* 134: 62-70.

**Trayhurn P., Wang B. y Wood I. S. (2008).** Hypoxia in adipose tissue: A basis for the dysregulation of tissue function in obesity? *British Journal of Nutrition* 100: 227-235.

**Trinder P. (1969).** Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annals of Clinical Biochemistry* 6: 24-27.

**Trujillo J., Chirino Yolanda I., Martínez-Tagüeña N. y Martínez-Tagüeña N. (2018).** Renal damage in the metabolic syndrome (MetSx): Disorders implicated. *European Journal of Pharmacology* 818: 554-568.

**Tsuchida A., Yamauchi T., Ito Y., Hada Y., Maki T., Takekawa S., Kamon J., Kobayashi M., Suzuki R., Hara K., Kubota N., Terauchi Y., Froquel P., Nakae J., Kasuga M., Accili D., Tobe K., Ueki K., Nagai R. y Kadowaki T. (2004).** Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 30817-30822.

## U

---

**Udenigwe C. C. y Rouvinen-Watt K. (2015).** The role of food peptides in lipid metabolism during dyslipidemia

and associated health conditions, *International Journal of Molecular Sciences* 16: 9303-9313.

#### **USDA Food Composition Databases.**

<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/>.

National Nutrient Database for Standard Reference Legacy Release. Abril, 2018.

## V

**Vaghef-Mehrabany E., Homayouni Rad A., Alipour B., Vaghef-Mehrabany L. y Saghafi Asl M. (2018).** Formulation and design of probiotic supplements for rheumatoid arthritis patients. *Pharmaceutical Sciences* 24: 44-51.

**Vander Wal J. S., Gupta A., Khosla P. y Dhurandhar N. V. (2008).** Egg breakfast enhances weight loss. *International Journal of Obesity* 32: 1545-1551.

**Varela-Moreiras G., Ruiz E., Valero T., Avila J. M., del Pozo S. (2013).** The Spanish Diet: An update. *Nutrición Hospitalaria* 28: 13-20.

**Vasques A. C. J., Cassani R. S. I., Forti A. C., Vilela B. S., Pareja J. C., Tambascia M. A., Geloneze B. y BRAMS investigators (2015).** Sagittal abdominal diameter as a surrogate marker of insulin resistance in an admixed population – Brazilian Metabolic Syndrome Study (BRAMS). *Plos One*. DOI: 140.1371/journal.pone.0125365.

**Vishram J. K. K., Borglykke A., Andreasen A. H., Jeppesen J., Ibsen H., Jørgensen T., Palmieri L., Giampaoli S., Donfrancesco C., Kee F., Mancina G., Cesana G., Kuulasma**

**K., Salomaa V., Sans S., Ferrieres J., Dallongeville J., Söderberg S., Arveiler D., Wagner A., Tunstall-Pedoe H., Drygas W. y Olsen M. H. (2014).** Impact of age and gender on the prevalence and prognostic importance of the metabolic syndrome and its components in Europeans. The MORGAM prospective cohort project. *Plos One*. DOI:10.1371/journal.pone.0107294.

## W

**Wada J. y Nakatsuka A. (2016).** Mitochondrial dynamics and mitochondrial dysfunction in diabetes. *Acta Medica Okayama* 70:151-158.

**Wahrenberg H., Hertel K., Leijonhufvud N. M., Persson L. G., Toft E. y Arner P. (2005).** Use of waist circumference to predict insulin resistance: retrospective study. *The BMJ* 330: 1363-1364.

**Wang X. y Hai C. (2015).** Redox modulation of adipocyte differentiation: hypothesis of “redox chain” and novel insights into intervention of adipogenesis and obesity. *Free Radical Biology & Medicine* 89:99-125.

**Wang G. y Wang T. (2009).** Egg yolk protein modification by controlled enzymatic hydrolysis for improved functionalities. *International Journal of Food Science and Technology* 44: 763-769.

**Wong S. K., Chin K. Y., Suhaimi F. H., Ahmad F., Jamil N. A. e Ima-Nirwana S. (2018).** Osteoporosis is associated with metabolic syndrome induced by high carbohydrate high-fat diet in a

rat model. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 98: 191-200.

**Wong S. K., Chin K. Y., Suhaimi F. H., Fairus A. e Ima-Nirwana S. (2016).** Animal models of metabolic syndrome: A review. *Nutrition & Metabolism*. DOI: 10-1186/s12986-016-0123-9.

**World Health Organization (2008).** Waist circumference and waist-hip ratio. Report of a WHO expert consultation. Ginebra: WHO Library Cataloguing in Publication Data.

**World Health Organization (2015).** Healthy diet. Fact sheet nº 394. Actualizado en Septiembre 2015.

**World Health Organization (2016).** Obesity and overweight Fact sheet. Visitado en junio de 2017.

**Wu W., Zhang J., Zhao C., Sun Y., Yin Y., Peng Y., Pang W. y Yang G. (2018).** Lentivirus-mediated CTRP6 silencing ameliorates diet-induced obesity in mice. *Experimental Cell Research* 367: 15-23.

**Wu L. Z., Zhou L. K., Chen C., Gong J. Y., Xu L., Ye J., Li D. y Li P. (2014).** Cidea controls lipid droplet fusion and lipid storage in brown and white adipose tissue. *Science China Life Sciences* 57: 107-116.

## X

---

**Xia N., Weisenburger S., Koch E., Burkart M., Reifenberg G., Förstermann U. y Li H. (2017).** Restoration of perivascular adipose tissue function in diet-induced obese mice without changing bodyweight.

*British Journal of Pharmacology* 174: 3443-3453.

**Xu C., Mathews A. E., Rodrigues C., Eudy B. J., Rowe C. A., O'Donoghue A. y Percival S. S. (2018).** Aged garlic extract supplementation modifies inflammation and immunity of adults with obesity: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Clinical Nutrition ESPEN* 24: 148-155.

**Xu J., Tian Y. S., Peng R. H., Xiong A. S., Zhu B., Hou X. L. y Yao Q. H. (2010).** Cyanobacteria MT gene SmtA enhance zinc tolerance in Arabidopsis. *Molecular Biology Reports* 37: 1105-1110.

**Xu A., Wang Y., Xu J.Y., Stejskal D., Tam S., Zhang J., Wat N. M. S., Wong W. K. y Lam K. S. L. (2006).** Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *Clinical Chemistry* 52: 405-413.

## Y

---

**Yang Z. H., Miyahara H., Takeo J. y Katayama M. (2012).** Diet high in fat and sucrose induces rapid onset of obesity-related metabolic syndrome partly through rapid response of genes involved in lipogenesis, insulin signaling and inflammation in mice. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 4: 32.

**Yerlikaya A., Dägel T., King C., Kuwabara M., Lanspa M. A., Andres-Hernando A., Covic A., Jacek M., Sag A. A. y Kanbay M. (2017).** Dietary and commercialized fructose: Sweet or sour? *International Urology and Nephrology* 49: 1611-162.

- You S. J., Udenigwe C. C., Aluko R. E. y Wu J. (2010).** Multifunctional peptides from egg white lysozyme. *Food Research International* 43: 848-855.
- You S. J. y Wu J. (2011).** Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of egg protein hydrolysates produced with gastrointestinal and non gastrointestinal enzymes. *Journal of Food Science* 76: C801-C807.
- Young D., Fan M. Z. y Mine Y. (2010).** Egg yolk peptides up-regulate glutathione synthesis and antioxidant enzyme activities in a porcine model of intestinal oxidative stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 7624-7633.
- Yoursr M. y Howell N. (2015).** Antioxidant and ACE inhibitory bioactive peptides purified from egg yolk proteins. *International Journal of Molecular Sciences* 16: 29161-29178.
- Yu Z., Liu B., Zhao W., Yin Y., Liu J. y Chen F. (2012).** Primary and secondary structure of novel ACE-inhibitory peptides from egg white protein. *Food Chemistry* 133: 315-322.
- Yu Z., Yin Y., Zhao W., Wang F., Yu Y., Liu B., Liu J. y Chen F. (2011a).** Characterization of ACE-inhibitory peptide associated with antioxidant and anticoagulation properties. *Journal of Food Science* 76: C1149-C1155.
- Yu Z., Zhao W., Ding L., Yu Y. y Liu J. (2016).** Anxiolytic effects of ACE inhibitory peptides on the behavior of rats in an elevated plus-maze. *Food & Function* 7: 491-497.
- Yu Z., Zhao W., Liu J., Lu J. y Chen F. (2011b).** Novel peptides derived from egg White protein inhibiting alpha-glucosidase. *Food Chemistry* 129: 1376-1382.
- Yu Z., Zhao W., Liu J., Lu J. y Chen F. (2011c).** QIGLF, a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from egg white protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91: 921-926.
- 
- Z**
- 
- Zambrowicz A., Eckert E., Pokora M., Bobak Ł. Dąbrowska A., Szołtysik M., Trziszka T. y Chrzanowska J. (2015a).** Antioxidant and antidiabetic activities of peptides isolated from a hydrolysate of an egg-yolk protein by-product prepared with a proteinase from Asian pumpkin (*Cucurbita ficifolia*). *RSC Advances* 5: 10460-10467.
- Zambrowicz A., Pokora M., Setner B., Dąbrowska A., Szołtysik M., Babij K., Szewczuk Z., Trziszka T., Lubec G. y Chrzanowska J. (2015b).** Multifunctional peptides derived from an egg yolk protein hydrolysate: isolation and characterization. *Amino Acids* 47: 369-380.
- Zeng J., Deng S., Wang Y., Li P., Tang L. y Pang Y. (2017).** Specific inhibition of acyl-CoA oxidase-1 by an acetylenic acid improves hepatic lipid and reactive oxygen species (ROS) metabolism in rats fed a high-fat diet. *The Journal of Biological Chemistry* 292:3800-3809.

**Zhou X., Han D., Xu R., Li S., Wu H., Qu C., Wang F., Wang X. y Zhao Y. (2014).** A model of metabolic syndrome and related diseases with intestinal endotoxemia in rats fed a high fat and high sucrose diet. *Plos One*.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0115148.